



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Modulación de la activación de receptores muscarínicos M₂
por autoanticuerpos séricos de pacientes chagásicos con
disautonomía**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área de Química Biológica

Sabrina Paola Beltrame

Director de Tesis: Juan Carlos Goin

Consejero de Estudios: Juan Carlos Calvo

Lugar de trabajo: Laboratorio de Farmacología Molecular, Centro de
Estudios Farmacológicos y Botánicos, Facultad de Medicina,
Universidad de Buenos Aires (CEFyBO-CONICET-UBA)

Fecha de Defensa: 13/12/18

Buenos Aires

RESUMEN

Estudios previos han demostrado una fuerte asociación entre la presencia de autoanticuerpos IgG circulantes contra el receptor muscarínico M_2 (RM_2) y la evidencia de disautonomía cardiovascular, así como una correlación positiva significativa entre los niveles séricos de anticuerpos (Ac) anti- RM_2 y el grado de inhibición vagal, en pacientes chagásicos crónicos. Al unirse al segundo loop extracelular (II-LEC) del RM_2 , estos Ac activan a su receptor blanco, estimulando vías de señalización acopladas a proteína G_i . Además, los Ac anti- RM_2 pueden atenuar el efecto inotrópico negativo de agonistas muscarínicos en la aurícula aislada de rata. Basados en estos antecedentes, postulamos que la exposición de los RM_2 a los Ac anti- RM_2 podría promover una inhibición de la señalización estimulada por agonista a través de este receptor. Utilizando procedimientos luminométricos basados en la “transferencia de energía bioluminiscente en resonancia” (BRET) y la activación de acuorina en sistemas de expresión heteróloga (células HEK 293T), demostramos que la fracción IgG sérica de pacientes chagásicos con disautonomía (IgG ChD) modula positivamente la interacción RM_2/ RM_2 e inhibe tanto la señalización acoplada a proteína G_i como el reclutamiento de arrestina-2 (Arr-2) al RM_2 , cuando ambos procesos son estimulados por agonista. Estos efectos no pudieron ser mimetizados ni por la fracción IgG de individuos controles seronegativos para Ac anti- RM_2 , ni por el fragmento monovalente Fab de la fracción IgG ChD, sugiriendo que los Ac anti- RM_2 bivalentes promueven un cambio conformacional en la molécula del RM_2 a través de *crosslinking* de receptores, afectando de esta manera la activación del receptor por el agonista. Dado que IgG ChD no logró promover ni el reclutamiento de Arr-2 al RM_2 ni la internalización de este receptor en células HEK 293T, es improbable que los efectos inhibitorios de los Ac anti- RM_2 sobre la señalización mediada por RM_2 se deban a una regulación homóloga del receptor a corto plazo. Alternativamente, postulamos que estos Ac ejercen un efecto alostérico negativo sobre el RM_2 a través de la interacción con el sitio alostérico común, en el II-LEC. En base a estos resultados proponemos que los efectos inhibitorios de los Ac anti- RM_2 sobre la señalización estimulada por acetilcolina, a través de la activación de RM_2 cardíacos, podrían contribuir a la inhibición de la función vagal en pacientes chagásicos crónicos.

Palabras claves: autoanticuerpos, receptor muscarínico M_2 , Chagas, disautonomía, activación del receptor, señalización, modulación alostérica

Modulation of M₂ muscarinic receptor activation by serum autoantibodies from Chagas disease patients with dysautonomia

ABSTRACT

Previous studies have demonstrated a strong association between the presence of circulating IgG autoantibodies against M₂ muscarinic acetylcholine receptors (M₂R) and evidence for cardiovascular dysautonomia, as well as a significant positive correlation between serum levels of anti-M₂R antibodies (Ab) and the degree of vagal inhibition, in chronic Chagas disease patients. Upon binding to the second extracellular loop (II-ECL) of the M₂R, these Ab activate their target receptor and thereby stimulate G_i protein-coupled signaling pathways. Besides, anti-M₂R Ab can attenuate the negative inotropic effect of muscarinic agonists on rat isolated atria. Based on this background, we proposed that the exposure of M₂R to anti-M₂R Ab could promote inhibition of agonist-induced M₂R-mediated signaling. Using luminometric procedures based on “bioluminescence resonance energy transfer” (BRET) and aequorin activation in heterologous expression systems (HEK 293T cells), we demonstrated that the serum IgG fraction from Chagas disease patients with dysautonomia (ChD IgG) positively modulates M₂ receptor/receptor interaction and inhibits both agonist-induced G_i protein-coupled signaling and arrestin-2 recruitment to the M₂R. These effects could not be mimicked by the IgG fraction of control individuals, who are seronegative for anti-M₂R Ab, or by the monovalent Fab fraction derived from ChD IgG, suggesting that bivalent anti-M₂R Ab promote a conformational change in the receptor molecule through receptor *crosslinking*, thereby impairing agonist-induced receptor activation. Because ChD IgG failed to promote both Arr-2 recruitment to its target receptor and M₂R internalization in HEK 293T cells, it is unlikely that the inhibitory effects of anti-M₂R Ab on M₂R-mediated signalling are due to short-term homologous receptor regulation. Alternatively, we propose that these Ab exert a negative allosteric effect on M₂R through interaction with the common allosteric site at the receptor’s II-ECL. Based on these results, we propose that the inhibitory effects of anti-M₂R Ab on acetylcholine-stimulated signalling through cardiac M₂R activation could contribute to the inhibition of vagal function in chronic Chagas disease patients.

Key words: autoantibodies, M₂ muscarinic receptor, Chagas, dysautonomia, receptor activation, signaling, allosteric modulation

AGRADECIMIENTOS

Quisiera tomarme un tiempo para agradecer a todas las personas que me acompañaron en estos años y que, de alguna manera, hicieron posible que pudiera llevar a cabo las diferentes etapas de ésta Tesis de Doctorado.

En primer lugar, quisiera agradecer al Dr Juan Goin, por haber confiado en mí y haberme recibido en su laboratorio. Hemos recorrido un largo camino juntos que implicó desde poner a punto todas las técnicas que se manejan en el laboratorio hasta la escritura y defensa de esta Tesis. En este camino, nos hemos encontrado con infinidad de dificultades que supimos sobrellevar juntos, a base de confianza y muchas horas de trabajo, para poder sacar adelante el laboratorio y este proyecto de tesis doctoral. Muchas gracias por haberme entrenado con paciencia y dedicación, por la contención en los momentos difíciles, por las horas dedicadas a la discusión de resultados y por la disponibilidad de todos los recursos necesarios para el desarrollo de este trabajo.

Quisiera también agradecer a Claudia Waldner por su amistad y colaboración a lo largo de este proyecto. Gracias por las meriendas compartidas, por las palabras de aliento y por simplemente estar desinteresadamente.

Además, quisiera agradecer a Claudia Mongini por sus consejos, palabras y por su ayuda desinteresada.

A mis compañeros de grupo, principalmente a Lucas, por haber logrado que las tardes de los jueves y viernes, encerrados en el cuarto del lector de placas llevando a cabo los diferentes ensayos, hayan sido más amenas y divertidas. Gracias por el tutorial de como realizar una tabla de contenidos, por las palabras de aliento y esos mates perfectos que, según dice, algún señor gaucho le enseñó en su paso por el norte argentino. Junto con Laureano, lograron descontracturar los últimos meses de ensayos para finalizar la tesis.

También quisiera agradecer a toda la gente del CEFyBO (administrativos, de mantenimiento, técnicos, pasantes, becarios e investigadores), que logró generar un ambiente cálido de trabajo donde priman los valores de compañerismo, respeto y solidaridad. Por otro lado, también me gustaría agradecer la buena predisposición de todo el personal de la 2da Cátedra de Farmacología de la Facultad de Medicina.

A todas las chicas del piso 16 y 17, especialmente a Klauchi y Cyn, con las cuales sigo manteniendo una linda amistad a distancia. Por esos “after lab” de los viernes en el piso 17, eran lo más!

A todas las chicas que han pasado por el LICyM, especialmente a Normi, Juli y Leti, también Ale, Agus y Flor. Gracias por su amistad y por compartir tan lindos momentos dentro y fuera del labo.

También quería destacar la labor de Juan Carlos Calvo como Consejero de estudios y agradecer su predisposición para contestar cada una de mis consultas a lo largo de estos años.

Gracias al personal de la Secretaría de Química Biológica, principalmente Ayelén, por su buena predisposición y dedicación para responder mis inquietudes. Siempre explicando con claridad y paciencia.

Quería agradecer al CONICET por financiar mi doctorado con las Beca tipo I y tipo II así como con los subsidios de investigación.

También quisiera destacar la participación de los doctores Sergio Auger, Ahmed Sabra y Claudio Bilder, gracias por su colaboración en el reclutamiento y evaluación médica de los pacientes chagásicos estudiados.

Quería agradecer a mis padres por siempre haber alentado mi estudio y que finalizara la carrera de doctorado cuando cada día parecía más lejano. Gracias por cuidar de Mica en este último mes y medio en el cual estuve finalizando la escritura de la Tesis y por estar siempre dispuestos a ayudarme en cualquier cosa que necesite. Los quiero mucho y agradezco a la vida tenerlos conmigo y que puedan disfrutar de su nieta así como yo disfruté de mis abuelos.

A mis hermanos, gracias Gaby por haber cuidado a Mica en este último tiempo y por preguntarme cada día como iba con mi tesis y gracias Gato por enviarme palabras de aliento desde Australia y por Emma, mi hermosa sobrina, siempre tan alegre y vivaracha!

Gracias Cristina, por cuidar de Mica los días que necesité juntarme con mi Director de Tesis durante las correcciones de este manuscrito.

Muchas gracias a todas mis amigas de la facu Ivi, Marian, Marien, Piku, Sole, Ana y Mel, son lo mejor y máspreciado que me dejó la Facultad. Ustedes hicieron más amenos todos los años de estudio de la Licenciatura y del Doctorado. Porque realmente entienden

lo que conlleva realizar un doctorado. Las horas de trabajo de mesada que uno invierte, los feriados, fines de semana y tardes-noches obteniendo y analizando datos, las frustraciones cuando los experimentos no dan, las alegrías cuando los planetas se alinean y salen los ensayos y uno tiene una “racha” de buenos resultados, esos que nos ponen una gran sonrisa de satisfacción. Gracias por estar siempre!

Gracias a mi nuevos compañeros y amigos de trabajo en Biosidus. Sin ustedes este cambio de ámbito laboral tan desafiante no hubiese sido posible. Quiero agradecer especialmente a Florencia Zalazar por su apoyo incondicional y desinteresado durante estos últimos cuatro años, por entender mis frustraciones y por alentarme a finalizar la escritura de la tesis. Gracias por facilitar, junto con Marcelo Caamaño, que pudiera tomarme los días de estudio necesarios para finalizar este proyecto.

Gracias a mis amigas de la vida, Sole, Yani y Juli por ofrecerme tan linda amistad, y por formar parte de mi vida hace ya casi 30 años. Perdón por tantas salidas postergadas durante el desarrollo de la tesis y su escritura. Gracias por escucharme y compartir tan lindos momentos juntas. Las quiero mucho!

Finalmente, quisiera agradecer a mi compañero de vida, Gonzalo, quien realmente conoce mis alegrías y mis enojos, mis frustraciones y satisfacciones, mis sentimientos encontrados en cuanto a esta tesis. Las horas y horas de trabajo de mesada y escritura invertidas, las llegadas tarde en la noche volviendo del labo. Gracias por acompañarme al CEFyBO tantos fines de semana. Supiste alentarme en este recorrido con la palabra justa y fuiste y sos la persona que más confió en que yo pudiera finalizar este trabajo de tesis si así me lo proponía. Gracias por todo, por quererme incondicionalmente y por este lindo proyecto de familia que embarcamos juntos hace ya 12 años. Te quiero mucho!

Por último, gracias a Micaela por lograr que cada día de mi vida sea una linda locura. Mica ha estado presente en las últimas etapas de esta tesis. En mayo de 2015, cursando los últimos puntos de mi doctorado, me enteré que estaba embarazada, todavía en mi panza terminamos de escribir M&M. Luego nació y cambiaron las prioridades. 2016 fue un año de cambios y nuevas experiencias, de crecer juntas con papá. 2017 y 2018 fueron dos años de idas y vueltas con la tesis, que culminaron con la convicción y certeza de terminar con esta etapa de mi vida. Espero que cuando leas estas palabras entiendas la importancia de finalizar etapas o proyectos y de esforzarse para conseguir lo que uno quiere. Con tus cortos 2 años y 9 meses fuiste capaz de entender, a tu manera, mi

necesidad de finalizar la tesis. Pudiste sobrellevar junto a papá, las abuelas Bety y Cristina, el abu Alfredo y el tío Gaby mis ausencias en las últimas semanas de escritura y la postergación de nuestro tiempo compartido. Te quiero infinito!!

Muchísimas gracias a todos!

A mi familia

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	9
ABREVIATURAS	14
1. INTRODUCCIÓN	18
1.1. Receptores Acoplados a Proteínas G	18
1.1.1. Introducción	18
1.1.2. Activación de los GPCRs	19
1.1.3. Señalización mediada por GPCRs	20
1.1.3.1. Señalización dependiente de proteínas G	20
1.1.3.2. Señalización independiente de proteínas G	23
1.1.4. Ligandos ortostéricos y alostéricos	25
1.1.4.1. Ligandos ortostéricos	25
1.1.4.2. Ligandos Alostéricos	26
1.1.4.3. Ligandos funcionalmente selectivos (Agonistas sesgados o `Biased Agonists`)	26
1.1.5. Regulación de los GPCR	27
1.1.6. Oligomerización de los GPCR	29
1.1.6.1. Metodologías utilizadas para el estudio de la oligomerización	30
1.2. Receptores Colinérgicos Muscarínicos	31
1.2.1. Generalidades	31
1.2.2. El sitio ortostérico y sus ligandos	31
1.2.3. Los sitios alostéricos y sus ligandos	33
1.2.4. Señalización dependiente de proteína G	34
1.2.5. Señalización independiente de proteína G	35
1.2.6. Regulación de los receptores muscarínicos	37
1.2.7. Oligomerización de RM	38
1.3. Los GPCR y el Sistema Nervioso Autónomo	39
1.3.1. Rol de la señalización mediada por receptores autonómicos en la fisiología cardíaca	41
1.4. Regulación autonómica de la fisiología cardíaca	42
1.5. Monitoreo de la expresión y la función de GPCR en tiempo real, en células vivas	42
1.5.1. BRET para el monitoreo de interacciones proteína-proteína en tiempo real	43
1.5.2. Ensayo funcional para el monitoreo de la señalización acoplada a proteínas G	46
1.6. Enfermedad de Chagas	48
1.6.1. Generalidades	48
1.6.2. Transmisión	48

1.6.3.	Diagnóstico.....	49
1.6.4.	Clasificación de la Enfermedad de Chagas: Aspectos clínicos.....	50
1.6.4.1.	Alteraciones cardiovasculares.....	51
1.6.4.2.	Trastornos digestivos.....	52
1.6.5.	Tratamiento.....	53
1.6.6.	Control y prevención.....	53
1.6.7.	Disautonomía o síndrome disautonómico en la Enfermedad de Chagas.....	53
1.6.7.1.	Alteraciones histopatológicas.....	54
1.6.7.2.	Alteraciones funcionales.....	54
1.6.8.	Teorías sobre la fisiopatología de la enfermedad de Chagas.....	56
1.6.9.	Anticuerpos séricos contra receptores a neurotransmisores en la enfermedad de Chagas.....	58
1.6.9.1.	Generalidades.....	58
1.6.10.	Anticuerpos circulantes contra el receptor muscarínico M ₂ en la enfermedad de Chagas.....	59
1.6.10.1.	Introducción.....	59
1.6.10.2.	Interacción con el RM ₂	59
1.6.10.3.	Activación del RM ₂	60
1.6.10.4.	Mecanismos inmunofarmacológicos asociados a la activación del RM ₂	62
1.6.10.5.	Regulación de la expresión y la función del RM ₂	63
1.6.10.6.	Correlación entre la presencia de Acs anti-RM ₂ y la patología.....	64
2.	HIPÓTESIS	67
2.1.	Hipótesis de Trabajo	67
3.	OBJETIVOS	69
3.1.	Objetivo General	69
3.2.	Objetivos Específicos	69
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	70
4.1.	Drogas	70
4.2.	Caracterización clínica y serológica de los pacientes	70
4.2.1.	Reclutamiento de los pacientes.....	70
4.2.2.	Evaluación clínica de los pacientes.....	70
4.2.3.	Evaluación del Sistema Nervioso Autónomo de los pacientes.....	71
4.3.	Actividades relacionadas con los anticuerpos a evaluar	72
4.3.1.	Obtención y conservación de sueros.....	72
4.3.2.	Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA).....	72
4.3.3.	Purificación de la fracción IgG sérica.....	73
4.3.4.	Aislamiento de la fracción IgG monoespecífica anti-pM ₂	74
4.3.5.	Aislamiento del fragmento Fab.....	74

4.4. Actividades relacionadas con los sistemas de expresión de receptores	75
4.4.1. Preparación de ADN plasmídico.	75
4.4.1.1. Preparación de bacterias competentes	75
4.4.1.2. Transformación de bacterias competentes	76
4.4.1.3. Purificación del ADN plasmídico.	76
4.4.1.4. Construcciones plasmídicas.....	77
4.4.2. Cultivo de células de mamífero y transfección transitoria	77
4.5. Monitoreo de las interacciones receptor/receptor en células vivas	77
4.5.1. Preparación del sistema celular BRET	78
4.5.2. Tratamiento de las células con ligandos muscarínicos y/o anticuerpos	78
4.5.3. Cuantificación de la señal de BRET	79
4.6. Monitoreo de las interacciones receptor/receptor membranas crudas.....	80
4.6.1. Preparación de membranas celulares	80
4.7. Monitoreo de la señalización dependiente de proteína G. Ensayo de acurina.....	81
4.7.1. Preparación del sistema celular	81
4.7.2. Monitoreo de $[Ca^{2+}]_i$ mediante luminometría	81
4.7.3. Tratamiento de las células con ligandos muscarínicos y/o anticuerpos	82
4.7.4. Expresión de los resultados.....	82
4.8. Monitoreo de la interacción RM₂/arrestina-2 en células vivas.....	83
4.8.1. Preparación del sistema celular BRET	83
4.8.2. Monitoreo de los niveles de expresión de las construcciones transfectadas: mediciones de fluorescencia total y luminiscencia total.....	84
4.8.3. Detección de la interacción RM ₂ / Arr-2 mediante BRET.....	84
4.8.4. Tratamiento de las células con ligandos muscarínicos y/o anticuerpos	85
4.9. Internalización de RM₂.....	86
4.10. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida-SDS	87
4.11. Análisis estadístico.....	87
5. RESULTADOS	89
5.1. Caracterización clínica e inmunoserológica de los pacientes.....	89
5.2. Caracterización del efecto de la fracción IgG de pacientes chagásicos disautonómicos sobre la interacción RM ₂ /RM ₂ en células vivas.....	89
5.3. Caracterización del efecto modulador de la fracción IgG ChD sobre la interacción RM ₂ /RM ₂ en membranas celulares.....	94

5.4. Modulación de la interacción RM ₂ /RM ₂ por IgG ChD: Especificidad de la molécula de receptor	94
5.5. Modulación de la interacción RM ₂ /RM ₂ en células vivas: Comparación entre IgG ChD y ligandos muscarínicos clásicos.	97
5.6. Modulación de la interacción RM ₂ /RM ₂ en células vivas: Influencia de la activación del RM ₂ por IgG ChD en presencia o ausencia de agonista	99
5.7. Modulación de la interacción RM ₂ /RM ₂ en células vivas por IgG ChD: Especificidad de epítopo.	102
5.8. Modulación de la interacción RM ₂ /RM ₂ en células vivas por Acs anti-RM ₂ : Participación del sitio alostérico común (EDGE) del II-LEC del RM ₂	107
5.9. Modulación de la interacción RM ₂ /RM ₂ inducida por IgG ChD. Rol de la bivalencia del anticuerpo	107
5.10. Relación entre la reactividad anti-pM ₂ y el incremento de la interacción RM ₂ /RM ₂ de fracción IgG del suero de los pacientes ChD	112
5.11. Efecto modulador de la fracción IgG ChD sobre la señalización dependiente de proteína G _i , inducida por agonista. Caracterización del sistema bioluminiscente	115
5.12. Efecto de los Acs anti-RM ₂ de pacientes chagásicos con disautonomía sobre la modulación de la señalización dependiente de proteína G estimulada por agonista.	118
5.13. Monitoreo de la interacción entre receptores muscarínicos M ₂ y arrestina-2 en células vivas: Caracterización del sistema BRET utilizado.	120
5.14. Reclutamiento de Arr-2 al RM ₂ inducida por agonista. Efecto modulador de Acs anti-RM ₂ de pacientes chagásicos con disautonomía.....	124
5.15. Modulación de la señalización dependiente e independiente de proteínas G por Acs anti-RM ₂ . Desensibilización/internalización del receptor o modulación alostérica?	126
6. DISCUSIÓN	132
6.1. Caracterización clínica e inmunológica de los pacientes estudiados	133
6.2. Modulación de la interacción RM ₂ /RM ₂ por Acs anti-RM ₂ de pacientes chagásicos disautonómicos	133
6.3. Implicancias farmacológicas de la modulación de la interacción entre RM ₂ /RM ₂ por Acs anti-RM ₂ de pacientes chagásicos con disautonomía	137
6.4. Modulación por IgG ChD de la señalización dependiente de proteína G _i activada por agonista.....	138
6.5. Modulación por IgG ChD del reclutamiento de arrestina al RM ₂ activado por agonista (señalización independiente de proteína G _i)	139

6.6. Importancia de la bivalencia del anticuerpo en el efecto inhibitorio de los Acs anti-RM ₂ sobre la señalización estimulada por agonista.....	139
6.7. Efecto agonista vs efecto inhibidor de los Acs anti-RM ₂	140
6.8. Posible mecanismo de acción de los Acs anti-RM ₂ sobre la modulación de la señalización dependiente e independiente de proteínas G estimulada por agonista.....	141
6.9. Implicancias fisiopatológicas de los efectos inhibitorios de los Acs anti-RM ₂ sobre la señalización mediada por agonista en la enfermedad de Chagas.	144
7. <i>REFERENCIAS</i>	147

ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclasa
ACh	Acetilcolina
ACV	Accidente cardiovascular
ADP	Adenosina difosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
Acs anti-RM ₂	Anticuerpos contra el receptor muscarínico M ₂
AP-2	Proteína activadora 2
ApoAc	Apoacuorina
Arr-2	Arrestina-2
Arr-3	Arrestina-3
Arr-2-YFP	Arrestina-2 fusionada a YFP en su extremo C-terminal
ATP	Adenosina trifosfato
A-V	Aurículo-ventricular
B _{max}	Capacidad de unión máxima
BRET	Transferencia de energía bioluminiscente en resonancia
BSA	Seroalbúmina bovina
CHO	Células derivadas de ovario de hámster chino
DAG	Diacilglicerol
DNS	Disfunción del nódulo sinoauricular
DTM	Dominios transmembrana
DVI	Disfunción del ventrículo izquierdo
EC ₅₀	Concentración efectiva media o 50
ECG	Electrocardiograma
ED	Ejercicio dinámico
ELISA	Enzimoimmunoensayo
ERK1/2	Proteínas kinasas 1/2 reguladoras de señales extracelulares

FRET	Transferencia de energía fluorescente en resonancia
FC	Frecuencia cardíaca
FSC	Espectroscopía de correlación de fluorescencia
GDP	Guanosina difosfato
GIRK	Canales rectificador de potasio acoplado a proteína G
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GRK	Proteína kinasa de GPCR
GTP	Guanosina trifosfato
HEK 293T	Células embrionarias de riñón humano, línea 293T (ATCC)
IC	Índice cardioraxico
IgG Ch	Fracción IgG sérica de pacientes chagásicos crónicos
IgG Ch anti-pM ₂	Fracción IgG monoespecífica contra el péptido muscarínico pM ₂
IgG ChD	Fracción IgG sérica de pacientes chagásicos crónicos con disautonomía
IgG ChND	Fracción IgG sérica de pacientes chagásicos crónicos sin disautonomía
IgG Control	Fracción IgG sérica de pacientes controles no infectados
IP ₃	Inositol-1,4,5-trifosfato
IR	Índice de reactividad
K _d	Constante de disociación en el equilibrio
Kir3	Canales rectificador de potasio acoplado a proteína G (GIRK)
KRHA	Buffer Krebs-Hepes-Ringer suplementado con BSA
LEC	<i>Loop</i> extracelular
Lf	Fracción de luminiscencia
LIC	<i>Loop</i> intracelular
Lpm	Latidos por minuto
MAPK	Proteína kinasa activada por mitógenos
MV	Maniobra de Valsalva

NA	Noradrenalina
NAL	Modulador alostérico neutro (o silencioso)
NAM	Modulador alostérico negativo
NMS	N-metil escopolamina
NOS	Óxido nítrico sintasa
PA	Presión arterial
PAM	Modulador alostérico positivo
PBS	Buffer fosfato salino
PEG	Prueba ergométrica graduada
PGE	Prostaglandina E2
PIP ₂	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PI ₃ K	Fosfoinositol-3 kinasa
PKA	Proteína kinasa A
PKC	Proteína kinasa C
PLA	Fosfolipasa A
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
pM ₂	Péptido sintético con la secuencia aminoacídica '169-192' del RM ₂ humano
PTX	Toxina de <i>Bordetella pertussis</i>
QNB	Quinuclidil bencilato
R α A	Receptor α -adrenérgico
R β A	Receptor β -adrenérgico
RE	Retículo endoplasmático
RLU	Unidades relativas de luminiscencia
RLuc	Luciferasa de <i>Renilla reniformis</i>
RM _{1,5}	Receptor muscarínico de acetilcolina, subtipos (1-5)
RM ₂ -RLuc	RM ₂ fusionado a RLuc en su extremo C-terminal

RM ₂ -YFP	RM ₂ fusionado a YFP en su extremo C-terminal
Rx	Radiografía
RV	Relación de Valsalva
SFB	Suero fetal bovino
SMN	Modulador alostérico silencioso (o neutro)
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNP	Sistema nervioso parasimpático
SNS	Sistema nervioso simpático
SpIDA	Análisis de distribución de intensidad espacial
Src	Proteína tirosin kinasa proto-oncogénica
TIRFM	Microscopía de fluorescencia de reflexión interna total
YFP	Proteína fluorescente amarilla

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Receptores Acoplados a Proteínas G*

1.1.1. *Introducción*

Los *receptores acoplados a proteínas G* (GPCRs, según siglas en inglés) constituyen la familia de receptores de membrana más grande, ubicua y versátil del reino animal. Con más de 800 miembros identificados dentro del genoma humano, se estima que representan aproximadamente el 1% del mismo [1, 2]. Consisten en una única cadena polipeptídica con una estructura conservada de siete dominios α -hélice transmembrana (DTM) hidrofóbicos con un extremo amino-terminal extracelular (N-terminal), tres *loops* extracelulares (LEC), tres *loops* intracelulares (LIC) y un extremo carboxi-terminal intracelular (C-terminal). Los DTM son altamente conservados y la mayor diversidad estructural se observa en los *loops* (secuencia y longitud) y en los extremos carboxi y amino-terminales (Figura 1) [3, 4].

Estos receptores son activados por una gran variedad de señales químicas como aminas biógenas, aminoácidos, péptidos, lípidos, nucleósidos, neurotransmisores, grandes polipéptidos e incluso la luz; y están involucrados en diversos procesos fisiológicos como neurotransmisión, metabolismo celular, secreción, diferenciación y crecimiento celular, así como en las respuestas inmune e inflamatoria [1, 2, 5]. Más aún, los GPCR son de gran importancia para la industria farmacéutica ya que, aproximadamente, más del 50% de las drogas terapéuticas actualmente en uso actúan sobre estas biomoléculas [4, 5]. El sistema de clasificación más comúnmente utilizado categoriza a los GPCR en base a la homología de sus secuencias y similitudes funcionales [6, 7]: Clase A o tipo Rodopsina, Clase B o tipo Secretina, Clase C o Receptores para glutamato (metabotrópicos), Clase D o Receptores a feromona (Fúngicas), Clase E o Receptores a adenosina monofosfato cíclico (AMPC) y Clase F o Familia Frizzled/Smoothened [7]. Las Clases A, B, C y F se encuentran en mamíferos. La clase A es por lejos la más grande entre los vertebrados (>80% en humanos). Esta familia incluye a los receptores para aminas biógenas, entre los cuales están incluidos los receptores adrenérgicos y los receptores muscarínicos de acetilcolina.

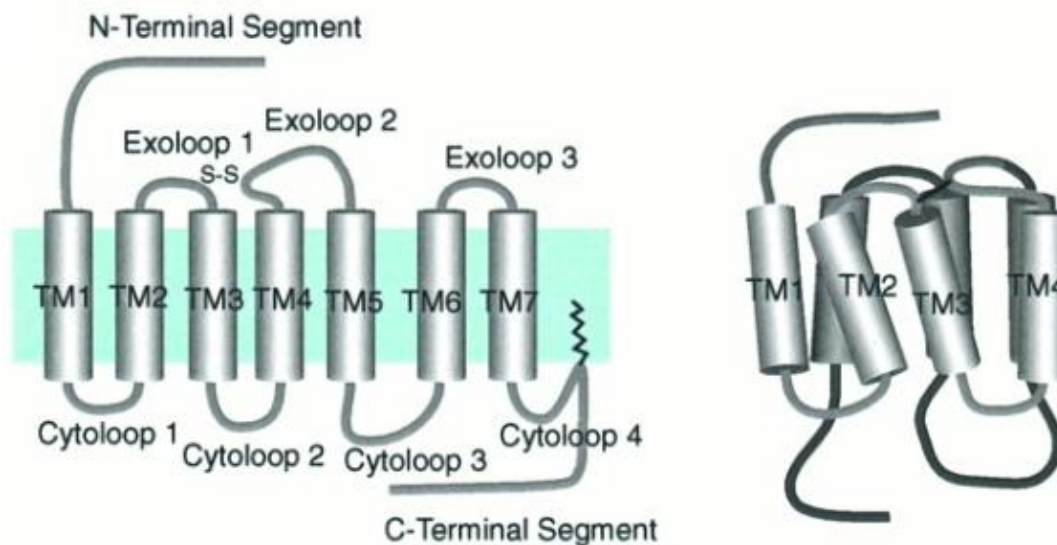


Figura 1. Representación esquemática de la estructura general de los GPCR. Estructura general de los GPCR de 7 DTM. TM: dominios transmembrana; Cytoloop: *loop* intracelular; Exoloop: *loop* extracelular; N-Terminal Segment: extremo amino-terminal; C-Terminal Segment: extremo carboxi-terminal. Tomado de Ji y col., 1998 [8].

1.1.2. Activación de los GPCRs

El mecanismo de activación del receptor consta de tres pasos: a) la unión del ligando, b) la generación de una señal que se transmite a través de los DTM hacia el interior celular y c) la transferencia de la señal a moléculas señalizadoras intracelulares [8]. En los miembros de la clase A de la familia de GPCR existe un motivo altamente conservado E/DRY (Glu/Asp-Arg^{3.50}-Tyr), ubicado en el límite entre el DTM3 y el II LIC. Este motivo participa en la transición entre los estados conformacionales inactivo (R) y activo (R*) del receptor [9]. Se ha propuesto que la Arg^{3.50} (de este motivo) está ubicada en un bolsillo hidrofílico formado por residuos polares conservados e interacciona con otros aminoácidos intramoleculares que mantienen al receptor en su estado R [9]. La activación del receptor promueve la salida de la Arg^{3.50} de este bolsillo y la exposición de secuencias escondidas en el II LIC y III LIC al citoplasma [10]. Además, la formación del estado R* también involucra el movimiento de los DTM3 y DTM6. Luego de la unión del ligando, el DTM3 presenta un leve movimiento en relación a la importante rotación antireloj del DTM6, que permite alejar el extremo citoplasmático del DTM6 (respecto del DTM3) y exponer residuos al citoplasma durante la activación del receptor [10].

1.1.3. Señalización mediada por GPCRs

Clásicamente, se consideraba que los GPCRs únicamente transmitían señales extracelulares al interior de la célula acoplándose a proteínas G heterotriméricas ancladas en la membrana plasmática. Sin embargo, en los últimos años este paradigma se ha modificado, ya que han surgido nuevas evidencias demostrando que estos receptores pueden señalizar mediante interacciones con otras proteínas intracelulares diferentes de las proteínas G, tales como como proteínas quinasas de GPCRs (GRKs), arrestinas y pequeñas proteínas G, entre otras [11, 12]. Actualmente, se piensa que cada GPCR activado por un ligando particular es capaz de activar un sistema específico de vías de señalización intracelular (dependientes e independientes de proteínas G), en un sistema celular determinado. Esto explica la versatilidad y diversidad de esta superfamilia de receptores. El efecto fisiológico neto de la estimulación de un receptor reflejará la suma de varias vías de señalización intracelular activadas con mayor o menor especificidad [12].

1.1.3.1. Señalización dependiente de proteínas G

Las clásicas vías de señalización de los GPCR son dependientes de las proteínas G heterotriméricas (compuestas por 3 subunidades, $G\alpha\beta\gamma$). Cuando un GPCR es estimulado por un ligando específico sufre cambios conformacionales alcanzando un estado "activo". Luego, expone dominios intracelulares con alta afinidad por proteínas heterotriméricas capaces de unir nucleótidos de guanina (proteínas G). En consecuencia, el receptor activado interacciona con la subunidad α de la proteína G, que inicialmente está unida a GDP, en su estado inactivo. La interacción receptor/proteína $G\alpha$ promueve cambios conformacionales en esta subunidad, por los cuales se reduce su afinidad por GDP y se incrementa su afinidad por GTP. Subsecuentemente, se produce un intercambio de GDP por GTP a nivel de $G\alpha$, generando una proteína G activada, que unida a GTP se separa del receptor y se disocia en sus subunidades $G\alpha$ activada y $G\beta\gamma$ (Figura 2). Cada uno de estos protómeros es capaz de amplificar y propagar la señal dentro de la célula, modulando la actividad de uno o más sistemas efectores, tales como enzimas de membrana y/o canales iónicos. El ciclo se completa cuando la subunidad $G\alpha$, con actividad de GTPasa intrínseca, cataliza la hidrólisis del GTP unido a GDP, con lo cual se produce la reasociación del heterotrímero $G\alpha\beta\gamma$, que ahora está en condiciones de unirse nuevamente a un receptor activado y reiniciar el ciclo, permitiendo así la amplificación de la señal [13]. Dentro de la pro-

teína G, el extremo carboxi-terminal de la subunidad $G\alpha$ es el principal dominio de reconocimiento del receptor [14, 15]. Sin embargo, el mismo no es el único dominio determinante de la especificidad de las interacciones GPCR/proteína $G\alpha$ [14].

Los sistemas enzimáticos cuya actividad puede ser modulada por las proteínas G son, clásicamente, adenilato ciclasas (AC) y fosfolipasas (PL). Cuando estas enzimas son activadas, catalizan la producción de segundos mensajeros, los cuales son moléculas pequeñas que desencadenan respuestas celulares activando diferentes cascadas de señalización. Algunos ejemplos de segundos mensajeros son: AMPc, inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3), diacilglicerol (DAG) y el ión calcio (Ca^{2+}) [16, 17].

En el genoma humano existen 16 genes que codifican 23 proteínas $G\alpha$. Estas proteínas, cuyo peso molecular varía de 39 a 45 kDa, se dividen en cuatro subtipos; $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ y $G\alpha_{12/13}$, [18, 19]. La señalización mediada por proteínas $G\alpha$ puede clasificarse de acuerdo a la función que cumple cada subtipo (Figura 2):

a) $G\alpha_s$ activa la enzima AC, que cataliza la hidrólisis de ATP para generar AMPc. En consecuencia, la activación de la proteína $G\alpha_s$ genera un aumento en la concentración intracelular de AMPc [20]. Los niveles celulares de AMPc pueden: i) modular la actividad de canales iónicos sensibles a este segundo mensajero o ii) estimular la actividad de proteínas quinasas A (PKA) que, a su vez, regula la actividad de varias proteínas involucradas en diferentes procesos celulares.

b) $G\alpha_{i/o}$ inhibe la actividad de la AC. Por lo tanto, la activación de $G\alpha_i$ inhibe la producción de AMPc y su subsecuente acumulación intracelular. En algunos sistemas celulares la inhibición de la síntesis de AMPc vía activación de $G\alpha_i$ sólo se observa cuando la AC es activada con forskolina o por receptores acoplados a $G\alpha_s$. Por otra parte, en células neuronales y endócrinas, los receptores acoplados a $G\alpha_i$ inhiben tanto la actividad de AC estimulada como la basal [21]. Más aún, en algunos sistemas G_i puede estimular la actividad de AC tipo II, probablemente mediante la liberación de complejos $\beta\gamma$ [22]. Además $G\alpha_i$ es capaz de activar proteínas quinasas Src [23].

Las proteínas $G_{i/o}$ son sensibles a la toxina de *Bordetella pertussis* (PTX), la cual es capaz de ADP-ribosilar las subunidades $G\alpha_{i/o}$. Esta modificación covalente bloquea el efecto de estas proteínas para inhibir a AC. Habitualmente, se utiliza PTX para poner de manifiesto la actividad inhibitoria de AC de la proteína G_i , observándose un incremento de AMPc luego del tratamiento con la toxina [13].

c) $G_{\alpha q/11}$ promueve la activación de la enzima fosfolipasa C (PLC), la cual cataliza el clivado del fosfolípido fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) en los segundos mensajeros IP₃ y DAG. Por un lado, IP₃ es liberado al citoplasma donde interacciona con sus receptores en la membrana del retículo endoplasmático (RE), promoviendo la liberación de Ca²⁺ desde este compartimiento hacia el citosol. Por su parte, el DAG retenido en la membrana plasmática estimula la actividad de proteínas kinasas C (PKC), en presencia de Ca²⁺ y fosfolípidos.

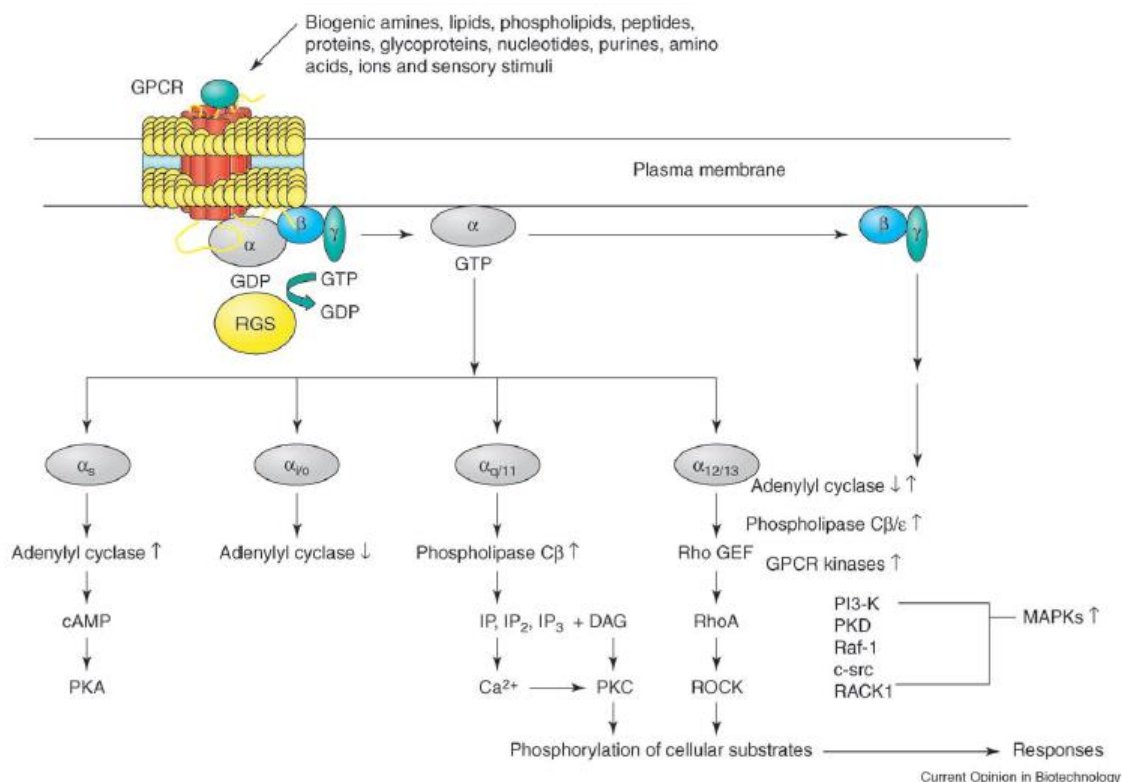


Figura 2. Vías de señalización activadas por GPCR: Miembros de la subfamilia G_{α_s} actúan principalmente estimulando la AC para producir el segundo mensajero, AMPc. El incremento intracelular de AMPc lleva a la activación de PKA y la fosforilación de distintos sustratos específicos que resultan en las respuestas celulares. La subfamilia de proteínas $G_{\alpha_{i/o}}$ actúan, esencialmente, inhibiendo la actividad de AC. Todos los miembros de la subfamilia $G_{\alpha_{q/11}}$ actúan primordialmente estimulando PLC $_{\beta}$, una enzima que promueve la hidrólisis de fosfoinosítidos (PI, PIP y PIP₂), dando lugar a la formación de inositol fosfatos (IP, IP₂ e IP₃) y DAG, un activador de PKC. Los inositoles fosfato promueven un incremento en los niveles de Ca²⁺ intracelular y la activación de PKC, así como otras proteínas dependientes de calcio. El principal sistema efector activado por la subfamilia $G_{\alpha_{12/13}}$ es el factor intercambiador de nucleótidos de guanina RhoGEF, que a su vez activa la pequeña proteína G Rho. Tomado de Thomsen, 2005 [24].

d) Los efectores relacionados con la señalización mediada por el subtipo $G_{\alpha_{12/13}}$ corresponden a la familia de las proteínas RhoGEF y están involucradas en fenómenos de regulación del citoesqueleto celular [25]. La proteína Rho estimulada por estiramiento es capaz de unirse y activar la fosfolipasa D (PLD) con la consecuente hidrólisis de la fosfatidilcolina en ácido fosfatídico y colina [26].

Por otro lado, existen 5 genes que codifican para la proteína G_{β} humana y 12 que codifican para la proteína G_{γ} humana, lo cual genera un gran número de combinaciones posibles de subunidades $G_{\beta\gamma}$ [19]. La activación de efectores a través de las subunidades $G_{\beta\gamma}$ es particularmente relevante en el caso de la transducción de señales mediadas por proteínas $G_{i/o}$ o G_q . Los efectores primarios de $G_{\beta\gamma}$ pueden ser canales iónicos, tales como los canales rectificadores de potasio (GIRK o canales Kir3) y los canales Ca^{2+} dependientes de voltaje, así como también algunas isoformas de AC, $PLC_{\beta 2}$ y $PLC_{\beta 3}$, la fosfoinositol-3 kinasa (PI_3K) [27] y proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPKs) [14, 19, 20]. La subunidad $G_{\beta\gamma}$ también puede inducir la fosforilación de la ERK1/2 a través de la PI_3K como parte de una vía que involucra tirosina kinasas, Shc, Grb2, Sos, Ras y Raf. No obstante, la proteína $G_{\alpha_{12}}$ también activa la vía ERK/MAPK [28].

1.1.3.2. Señalización independiente de proteínas G

En los últimos años, nuevas evidencias científicas han demostrado que algunos eventos fisiológicos desencadenados como consecuencia de la estimulación de los GPCR por agonista no son mediados por la activación de las proteínas G heterotriméricas [12] (Figura 3). Existen numerosos ejemplos de GPCRs que señalizan a través de la interacción con una gran variedad de proteínas intracelulares como GRKs, arrestinas, tirosina-kinasas (como Src y JAK) y las proteínas que contienen el dominio PDZ (como NHERF, PSD-95, MUPP1 y Grb2) [29].

Señalización via GRK: las GRKs, además de participar en los procesos de desensibilización del receptor activado, son intermediarias en procesos de señalización del receptor independientes de proteína G (Figura 3). El reclutamiento de GRKs al receptor activado puede regular directamente el citoesqueleto (GRK2 puede asociarse y fosforilar la tubulina [30, 31] y GRK5 puede interactuar con la actina [32]) así como modular otros procesos intracelulares [12].

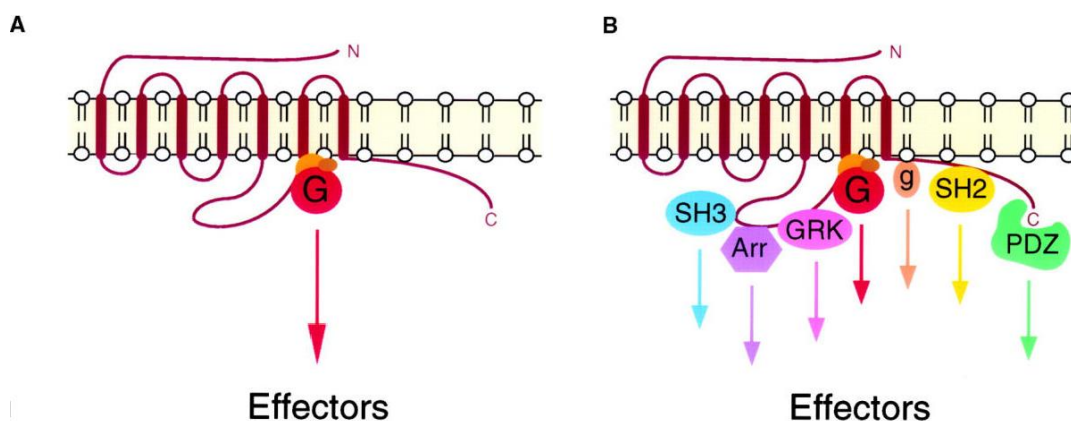


Figura 3. Representación esquemática de la señalización mediada por GPCRs. (Panel A). Luego de la unión con el agonista, los GPCRs activan proteínas G heterotrimericas (G), las cuales regulan la actividad de efectores celulares específicos. (Panel B). Luego de la unión del agonista, los GPCRs se asocian con miembros de diversas familias de proteínas intracelulares, incluyendo proteínas G heterotrimericas, proteínas conteniendo dominios SH3, proteínas quinasas de GPCR (GRK), arrestinas (Arr), pequeñas proteínas G (g), proteínas con dominios SH2, proteínas con dominios PDZ. Estas interacciones permiten que los GPCRs desencadenen múltiples rutas de señalización con cada subtipo de receptor acoplado a una batería específica de efectores (effectors). Tomado de Hall, 1999 [12]

Señalización via arrestina: el patrón general de funcionamiento de una señal dependiente de arrestina consiste en la formación de un complejo entre una arrestina unida a un GPCR activado por ligando y fosforilado por GRK (GPCR*-P) y un grupo de proteínas catalíticamente activas. De este modo la arrestina funciona como una proteína adaptadora (o “andamio”) capaz de reclutar actividad kinasa (de proteínas o lípidos), fosfatasa, fosfodiesterasa o ubiquitina ligasa al complejo arrestina/GPCR*-P. Las rutas mediadas por arrestinas más estudiadas son aquellas que involucran el reclutamiento de proteínas quinasas Src (a) y MAPK (b) [33-35].

(a) Se forma un complejo GPCR*-P /arrestina/Src, el cual desencadena: i) la fosforilación de dinamina, lo cual promueve la endocitosis del receptor; ii) el reclutamiento y la activación de MAPK.

(b) Se forman complejos GPCR*-P/arrestina, que promueven el reclutamiento y la activación de MAPK, los cuales se localizan en vesículas endocíticas. Finalmente, la activación de ERK1/2 puede facilitar la fosforilación de sustratos a nivel de la membrana plasmática, el citosol y el citoesqueleto [36].

1.1.4. *Ligandos ortostéricos y alostéricos*

1.1.4.1. *Ligandos ortostéricos*

El descubrimiento de nuevos fármacos para la modulación de la actividad de los GPCR se ha centrado generalmente en la caracterización de *ligandos ortostéricos*, es decir, aquellos que se unen al sitio del receptor con el cual interaccionan los ligandos endógenos. Para los GPCR de la Clase A, la estructura de este sitio puede describirse como un bolsillo molecular formado por los dominios α -hélice, generalmente cubierto por el II *loop* extracelular [37]

Clásicamente, los ligandos ortostéricos se definen por dos parámetros distintivos: su *afinidad* y su *eficacia o actividad intrínseca*. La *afinidad* describe la intensidad de la interacción ligando/receptor, mientras que la *eficacia* caracteriza la capacidad relativa del complejo ligando/receptor para desencadenar una respuesta biológica máxima [37]. La *potencia* del ligando, definida como concentración efectiva media (EC_{50}), depende de la afinidad y de la eficacia del mismo. Sobre la base del concepto de eficacia, se han definido cuatro clases de ligandos ortostéricos: a) *agonistas totales*: activan el receptor con la eficacia máxima que puede alcanzar el sistema b) *agonistas parciales*: activan el receptor con una eficacia parcial, es decir inferior a la del agonista total c) *antagonistas neutros*: no activan al receptor, o sea tienen eficacia nula, pero neutralizan la actividad de un agonista total, parcial o inverso, promoviendo una recuperación de la actividad basal. d) *agonistas inversos*: poseen una eficacia opuesta a la ejercida por agonistas, es decir, tienen capacidad para deprimir la actividad basal (en ausencia de agonistas). Este comportamiento farmacológico ocurre cuando los receptores poseen actividad constitutiva, concepto que pudo ser explicado mediante el modelo ternario.

El modelo del complejo ternario, el más ampliamente aceptado para describir la activación de los GPCR por agonista, tiene en cuenta las interacciones cooperativas entre el receptor, la proteína G y el ligando [10]. El mismo propone que el receptor existe en un equilibrio entre dos estados funcionales, inactivo (R) y activo (R*). En ausencia de agonista, el nivel de actividad basal del receptor está determinado por el equilibrio entre los estados R y R*. Por lo tanto, la eficacia del ligando está determinada por su capacidad para alterar el equilibrio entre ambos estados [10]. Según este paradigma, los agonistas totales y parciales estabilizan la conformación activa mientras que los agonistas inversos estabilizan la conformación inactiva. Por el contrario, los antagonistas neutros no afectan

el equilibrio entre ambas conformaciones. De acuerdo con este modelo, la magnitud de las respuestas de las diferentes vías de señalización activadas por un agonista de GPCR son proporcionales a la eficacia intrínseca del mismo [38].

1.1.4.2. *Ligandos Alostéricos*

En los últimos 20 años, se han descubierto una gran variedad de compuestos que median sus efectos a través de la interacción con sitios alostéricos topográficamente distintos a los sitios ortostéricos de los receptores, principalmente a secuencias ubicadas en los *loops* extracelulares [39]. Los ligandos que se unen a estos sitios alostéricos inducen cambios conformacionales en el receptor de manera tal que modifican sus propiedades interactivas respecto de los ligandos ortostéricos y otras proteínas de acoplamiento [40].

Los *ligandos alostéricos* modulan la actividad de los ligandos ortostéricos modificando positiva- o negativamente sus afinidades y/o sus eficacias. A diferencia de los ligandos ortostéricos, los alostéricos tienen la particularidad de ofrecer mayor selectividad de subtipo de receptor debido a la alta divergencia de la secuencia aminoacídica de los sitios alostéricos y la modulación selectiva del efecto de un ligando ortostérico para un dado subtipo de receptor [41]. Cabe aclarar que los ligandos alostéricos pueden modular, pero no activar o inhibir completamente la función del receptor, dado que la completa ocupación del sitio alostérico produce saturación del efecto [42].

Los ligandos alostéricos se clasifican en: a) inhibidores o moduladores alostéricos negativos (NAMs); b) potenciadores o moduladores alostéricos positivos (PAMs); c) moduladores alostéricos neutros o silenciosos (SMNs/NALs) [40, 41]; d) agonistas alostéricos, es decir, moduladores alostéricos con actividad intrínseca propia. En otras palabras, pueden modular la señalización celular *per se*, pero además tienen la capacidad de modular la actividad de ligandos ortostéricos y; e) agonistas bitópicos o dualstéricos: actúan simultáneamente uniéndose a sitios ortostéricos y alostéricos, así aprovechan la alta afinidad que les confiere el sitio ortostérico y la selectividad que les confiere el sitio alostérico [39].

1.1.4.3. *Ligandos funcionalmente selectivos (Agonistas sesgados o `Biased Agonists`)*

A mediados de los `90, se puso en evidencia que el modelo del complejo ternario no era suficiente para explicar la señalización mediada por GPCR. Numerosos trabajos mos-

traron que dichos receptores, luego de la unión del ligando, pueden adoptar diversas conformaciones e interactuar con diferentes proteínas de señalización intracelular y, consecuentemente, activar selectivamente distintas vías de señalización [43]. Este fenómeno, conocido como *selectividad funcional* (en inglés "*biased agonism*"), depende del complejo ligando/receptor (conformación activa del receptor específica del ligando) así como de su interacción con las múltiples proteínas citosólicas de señalización y postula; la existencia de múltiples conformaciones activas del receptor. Los agonistas capaces de estabilizar diferentes estados activos del receptor se conocen como *agonistas sesgados*, *agonistas funcionales* o *agonistas selectivos* (en inglés, "*biased agonists*") [43, 44].

Por ejemplo, mientras un agonista convencional (L) (no selectivo) interacciona con el receptor, activando 2 vías de señalización (I) y (II) con eficacias y/o potencias similares, otro ligando (M) (no selectivo) activa sólo una de las 2 vías o bien ambas, pero con diferentes potencias y/o eficacias entre sí. Las vías de señalización I y II pueden ser dependientes o independientes de proteínas G, indistintamente. Los sistemas que han despertado mayor interés, son aquellos en que los ligandos sesgados activan preferentemente una vía dependiente de proteínas G por sobre otra independiente de proteínas G (generalmente dependiente de arrestinas), o viceversa. Tanto los ligandos ortostéricos como los ligandos alostéricos pueden funcionar como ligandos sesgados [42].

1.1.5. Regulación de los GPCR

La actividad de los GPCRs está gobernada por un balance coordinado entre los mecanismos de señalización, desensibilización y resensibilización de los receptores. La disminución de la respuesta asociada como consecuencia de una estimulación prolongada o repetitiva por agonista se conoce como *desensibilización* del receptor. La desensibilización es un importante mecanismo fisiológico que protege al receptor contra la sobreestimulación aguda y crónica y permite regular su actividad [45].

Existen 3 familias de moléculas reguladoras que contribuyen al proceso de desensibilización de GPCR: proteínas kinasas dependientes de 2dos mensajeros, GRKs y arrestinas. La PKA y la PKC son ejemplos de kinasas dependientes de 2dos mensajeros y pueden fosforilar receptores activos y no activos. En cuanto a las GRK, se han identificado 7 isoformas (GRK1-7). Las isoformas GRK2, GRK3, GRK5 y GRK6 se encuentran distribuidas en todos los tipos celulares [46]. La fosforilación de los receptores por las GRKs no es suficiente para desensibilizar sino que crea sitios de alta afinidad en el receptor para la unión

de las arrestinas. Existen 4 arrestinas en mamíferos: dos arrestinas visuales (arrestina-1 y arrestina-4) y dos no visuales (arrestina-2 o β -arrestina, y arrestina-3 o β -arrestina-2). Las arrestinas no visuales se expresan de forma ubicua y regulan la expresión y la función de los GPCRs [45].

Se han descrito 2 procesos regulatorios que promueven desensibilización: *regulación homóloga* y *regulación heteróloga*. En el primer caso, sólo los receptores activados por agonista son desensibilizados y, en el segundo caso, tanto receptores activados como no activados por agonista pueden ser desensibilizados. Ambos tipos de desensibilización requieren la fosforilación del receptor.

La regulación homóloga comprende clásicamente 3 eventos bien caracterizados [45, 47]: a) *Desacople de la proteína G*: la activación del receptor por el agonista promueve, además de su interacción con proteínas G, la translocación de GRKs al receptor y su fosforilación en residuos de serina y treonina a nivel de uno o más dominios intracelulares, dependiendo del GPCR en cuestión. La translocación de GRK requiere la asociación de las subunidades $G\beta\gamma$, las cuales forman un puente intermolecular entre el receptor y la GRK [48]. El receptor fosforilado recluta proteínas citosólicas especializadas (arrestinas), que al unirse a los dominios fosforilados del receptor inhiben su interacción con proteínas G y, subsecuentemente, la respuesta asociada en cuestión de segundos. b) *Internalización del receptor*: la unión del GPCR a arrestina genera un complejo adaptador que recluta otras proteínas (Clatrina, AP-2), las cuales inducen la formación de invaginaciones en la membrana. Luego se produce la escisión de las vesículas endocíticas, donde participa la proteína dinamina, con actividad GTPasa. Una vez formadas las vesículas endocíticas, éstas entregan su carga a endosomas tempranos. Este proceso de internalización transcurre en cuestión de minutos. Algunos autores indican que la internalización se compone de dos procesos: b1) secuestro de receptores de la superficie celular; b2) endocitosis propiamente dicha, que involucra la formación de endosomas tempranos. c) *Reciclaje o regulación negativa ("down-regulation")*. El endosoma temprano tiene dos destinos posibles: c1) es integrado a endosomas de reciclaje, y el receptor es transportado nuevamente a la superficie celular; c2) se integra a endosomas tardíos, los cuales se fusionan con lisosomas donde el receptor es degradado en cuestión de horas, lo cual se traduce en una reducción del número total de receptores celulares [49]. Muchos GPCR requieren de ubiquitinación como proceso de regulación postendocítica, ya que direcciona los receptores endocitados hacia vías de degradación lisosomal. Por otro lado,

la ubiquitinación de arrestinas incrementa su reclutamiento a la membrana plasmática e, indirectamente, promueve la endocitosis de los receptores [47].

En la mayoría de los casos, la desensibilización fisiológica se alcanza mediante el desacople de la proteína G y la internalización constituye un proceso por el cual el receptor se separa de las arrestinas, es desfosforilado y reciclado a la superficie, con lo cual recupera su funcionalidad (resensibilización).

En la regulación heteróloga, la activación de un tipo de GPCR atenúa, no solamente aquella respuesta mediada por dicho receptor, sino otras señales mediadas por diferentes GPCR celulares. Ocurre generalmente cuando un GPCR estimulado por agonista activa rutas de señalización dependientes de proteínas G_s o $G_{q/11}$. Los segundos mensajeros generados, AMPc o DAG, activan respectivamente a PKA o PKC. Estas enzimas pueden catalizar la fosforilación de otro/s GPCRs en el III LIC promoviendo su desacople de proteínas G y subsecuente desensibilización [50].

1.1.6. Oligomerización de los GPCR

Numerosas evidencias experimentales obtenidas en los últimos 20 años han sugerido que, al menos, una gran parte de los GPCR conocidos pueden formar complejos diméricos o multiméricos en células vivas. Más aún, diferentes subtipos de GPCR e incluso, un mismo receptor en diferentes etapas de su ciclo de vida, pueden existir en diferentes estados de oligomerización (como monómeros, dímeros u oligómeros de mayor orden) [51]. A los fines prácticos, denominaremos homo- o heterooligómeros, a los complejos constituidos por el mismo tipo de receptor, o por receptores diferentes.

A continuación, se describen algunos ejemplos del rol fisiológico de la oligomerización de GPCR [52]:

- *Ontogenia*: para algunos receptores, la oligomerización cumple un importante rol en el control de calidad en el RE ya que enmascara señales específicas de retención así como porciones hidrofóbicas de la proteína, que de otra manera retendrían al receptor en el RE.
- *Unión de ligandos*: la unión del ligando al receptor puede regular al oligómero promoviendo o inhibiendo su formación. Sin embargo, algunos estudios sugirieron que los procesos de homo- o heterooligomerización son procesos constitutivos que no son modulados por la unión de ligandos.

- *Farmacología del receptor*: se ha demostrado, para ciertos GPCR, que la hetero-oligomerización puede modificar la afinidad de los ligandos por su receptor generando cooperatividad positiva o negativa.
- *Transducción de señales*: para algunos GPCR la heterodimerización es esencial para la formación de receptores funcionales. En otros casos, potencia la señalización respecto a la generada por cada protómero individual o promueve cambios en la selectividad de algunos GPCR hacia determinadas subfamilias de proteínas G.
- *Regulación del receptor*: varios estudios han sugerido que la heterodimerización puede afectar la endocitosis y la regulación negativa de GPCR promovida por agonista.

1.1.6.1. Metodologías utilizadas para el estudio de la oligomerización

A lo largo de los años se han generado una batería de metodologías que han permitido acumular gran cantidad de evidencias acerca de la hipotética naturaleza oligomérica de los GPCRs. A los métodos tradicionales tales como la unión de ligandos, *Blue Native-PAGE*, coimmunoprecipitación/Western Blot, y transcomplementación farmacológica, se han sumado modernas metodologías: 1) los *métodos biofísicos*, entre ellos, aquellos basados en la transferencia de energía bioluminiscente (BRET) o fluorescente (FRET) en resonancia permiten monitorear la existencia de oligómeros de GPCR constitutivos o inducibles, en tiempo real, en células vivas; 2) los *métodos fisiológicos* modernos, entre ellos, espectroscopía de correlación de fluorescencia (FSC), microscopía de fluorescencia de reflexión interna total (TIRFM) y análisis de distribución de intensidad espacial (SpIDA), utilizan microscopía de fluorescencia y permitieron cuantificar las interacciones en tejidos nativos, facilitaron el estudio de la dinámica de los receptores en cuanto a su tráfico y arrojaron información acerca del tiempo que los receptores permanecen formando oligómeros [51, 53]. Por último, 3) los *métodos computacionales* y los estudios de *cristalografía de alta resolución* han permitido predecir y dar información acerca de la estructura de los oligómeros de GPCRs y las interfaces entre sus protómeros constituyentes [51].

1.2. Receptores Colinérgicos Muscarínicos

1.2.1. Generalidades

Los receptores muscarínicos (RM) pertenecen a la clase A de la superfamilia de los GPCR. Mediante estudios de clonación se identificaron cinco subtipos de RM en mamíferos, M₁-M₅, donde cada subtipo de receptor es producto de un gen diferente. Estos receptores están presentes en todos los órganos, tejidos y tipos celulares del organismo [54]. En general, los distintos tejidos y líneas celulares muestran patrones de expresión diferencial de los subtipos de RM y esto resulta en diferencias a nivel de la función [54, 55]. Todos los RM se localizan en SNC. En particular, el RM₁ participa en funciones cognitivas (memoria y aprendizaje). El RM₄, expresado particularmente en hipocampo, cuerpo estriado y corteza, participa en los procesos de locomoción y comportamiento; mientras que los subtipos M₂ y M₃ son los receptores autonómicos efectores preponderantes en el músculo liso del aparato digestivo, vejiga, tejido vascular y respiratorio donde ambos participan, complementariamente, en la estimulación de la contracción muscular. En particular, el RM₂ es el RM más abundante en el músculo cardíaco, especialmente en aurícula y el nodo sinoauricular. El subtipo RM₃ se expresa, además, en glándulas exócrinas y endócrinas, en endotelio vascular, linfocitos y keratinocitos. El RM₅ es característico en SNC y linfocitos [56].

1.2.2. El sitio ortostérico y sus ligandos

El ligando endógeno de los RM es la acetilcolina (ACh), un neurotransmisor liberado por las neuronas colinérgicas del SNP y del SNC [57]. El sitio de unión de la ACh es un bolsillo formado por la cara extracelular de varios DTM donde, el DTM3 provee el fondo de la cavidad mientras que el DTM2 y DTM7 lo restringen. La interacción más importante entre el ligando endógeno ACh y su sitio de unión involucra al grupo amonio de ACh y Asp^{3.32} (conservado en los DTM3 de las aminas biógenas). Otros aminoácidos claves que participarían en la interacción son Tyr^{3.33}, Thr^{5.39}, Thr^{5.42}, Tyr^{6.51}, and Tyr^{7.3} [54]. Otros aminoácidos involucrados en la estabilización del sitio ortostérico son dos cisteínas conservadas que forman un puente disulfuro entre la porción extracelular del DTM3 y el II LEC. Existen uno o más sitios de glicosilación en el extremo N-terminal. Estudios de mutación dirigida, en donde se reemplazan aminoácidos específicos, demostraron que: a) la N-glicosilación del extremo N-terminal del receptor no es esencial para su expresión y

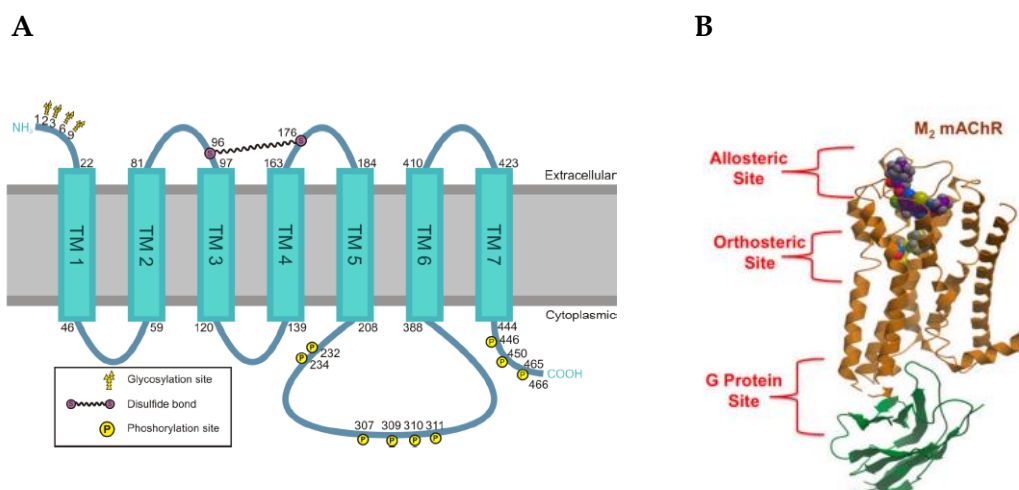


Figura 4. Estructura del receptor muscarínico subtipo M₂ (RM₂). (Panel A) El RM₂ pertenece a la familia de GPCR. Los 7DTM están conectados entre sí por *loops* extra- e intracelulares y el receptor presenta cuatro sitios de glicosilación en su extremo N-terminal. Los residuos aminoacídicos de serina 96 y 176 en el I y II LEC, respectivamente, están conectados entre sí por un puente disulfuro. A diferencia del III LIC, que consiste en 181 aminoácidos, el resto de los *loops* es relativamente pequeño. El extremo C-terminal y el III LIC pueden ser fosforilados en diversos residuos. Tomado de Ockenga y col., 2013 [54]. (Panel B) Dominios topográficamente distintos pero conformacionalmente vinculados dentro de los GPCR (sitio alostérico, sitio ortostérico y sitio de acoplamiento de proteína G). Estructura del RM₂ (PDB ID 4MQT) en complejo con un modulador alostérico positivo (LY02119620, púrpura), un agonista (iperoxo, amarillo) y un nanocuerpo (Nb9-8, verde) que estabiliza un estado activo del receptor. Tomado de Christopoulos y col., 2014 [58].

función (unión de ligando y señalización) [59]; b) la palmitoilación del extremo C-terminal ancla al receptor a la membrana plasmática. Si bien esta modificación post-traduccional no es un requisito indispensable para la interacción del RM con proteínas G, la palmitoilación del extremo C-terminal facilita el acoplamiento a proteína G, al menos en el RM₂ (Figura 4A) [60].

La similitud del sitio ortostérico entre los cinco subtipos de RM dificulta, por un lado, la caracterización farmacológica de los distintos subtipos de receptor y, por otro lado, la identificación de ligandos ortostéricos selectivos de subtipo [61, 62]. Además, frecuentemente las células expresan más de un subtipo de receptor, dificultando la identificación de un subtipo de receptor con una determinada función.

Los agentes parasimpaticomiméticos más comúnmente utilizados (carbacol, betanecol, metacolina, pilocarpina y oxotremorina M) son no selectivos de subtipo. Así como el agonista endógeno ACh, carbacol posee especificidad muscarínica y nicotínica, siendo su afinidad por los receptores muscarínicos (de alta afinidad) considerablemente mayor que

su afinidad por los los receptores nicotínicos (orden nM vs μ M, respectivamente). Betanecol posee escasa acción nicotínica, mientras que metacolina y pilocarpina son selectivamente muscarínicas.

Los antagonistas más empleados para el estudio de los RM son atropina, N-metilescopolamina (NMS) y quinuclidinil benzilato (QNB) y no exhiben selectividad de subtipo de receptor [62]. Sin embargo, hay compuestos que presentan mayor selectividad con respecto a uno o más subtipos, y se determina en función de afinidad de su interacción con el receptor, a saber: telenzepina (M_1); pirenzepina (M_1/M_4); AF-DX 116 y tipitramina, (M_2); AF-DX 384 e himbacina (M_2/M_4); zamifenacina, darifenacina (M_3/M_5), 4-DAMP ($M_1/M_3/M_4/M_5$). Cabe aclarar que los antagonistas muscarínicos pueden comportarse como agonistas inversos en sistemas celulares donde los RM exhiben actividad constitutiva.

1.2.3. *Los sitios alostéricos y sus ligandos*

Los RM han constituido sistemas modelo para comprender la modulación alostérica de la señalización mediada por GPGR. Las estructuras de los RM_2 y RM_3 inactivos muestran que estos receptores poseen un amplio vestíbulo extracelular capaz de unir moduladores alostéricos (Figura 4B). Esta cavidad se encuentra encima del sitio ortostérico y sufre una marcada contracción al activarse el RM_2 debido a la rotación del DTM6. El movimiento de este DTM provee un vínculo entre las 3 regiones esenciales del receptor: el vestíbulo extracelular, el sitio de unión ortostérico y la superficie intracelular. El acoplamiento entre estas 3 regiones puede explicar que los moduladores alostéricos puedan afectar la afinidad y la eficacia de ligandos ortostéricos, e incluso activar proteínas G en forma directa como agonistas alostéricos [63]. Además, la secuencia aminoacídica del sitio alostérico difiere entre los subtipos de receptor y respecto del sitio ortostérico lo cual permite el diseño de moduladores selectivos de subtipo de RM [62].

La galamina es un modulador alostérico negativo (NAM) clásico con un orden de potencia sobre los diferentes subtipos bien definido: $M_2 > M_1$, $M_4 > M_3$, M_5 . Este compuesto inhibe la potencia del efecto inotrópico negativo promovido por ACh o carbacol en la aurícula aislada, sin modificar su eficacia [64]. Estos datos, confirmados posteriormente, indican que galamina ejerce su efecto alostérico disminuyendo la afinidad del agonista muscarínicos por los RM_2 .

Estudios de mutagénesis dirigida y unión de ligandos revelaron que existen dos epitopes de unión para galamina en el RM₂ uno en el II LEC, representado por la secuencia acídica EDGE y otro que involucra aminoácidos del DTM6 y del III LEC. La mayor afinidad de galamina por RM₂ (respecto a los otros subtipos de RM) radica en que el ligando se une a ambos epitopes en este subtipo de RM, pero sólo al II LEC en RM₃ y RM₅, y únicamente a la región DTM6/III LEC en RM₁ y RM₄ [65].

Otro ejemplo de modulación alostérica que afecta particularmente al RM₂ es el compuesto experimental '628. Este modulador incrementa selectivamente la afinidad de NMS por el RM₂, según un orden de potencias similar al de galamina. Adicionalmente, éste compuesto disminuye la velocidad de disociación de NMS al RM₂, sin un efecto sustancial sobre los otros subtipos de RM. Finalmente, '628 potencia el efecto antagonista de NMS sobre la unión de [³⁵S]-GTPγS (a la proteína G_{αi} activada) en membranas de células hipotalámicas o miocárdicas (que expresan RM₂) estimulada por iperoxo o ACh. Llamativamente, '628 no altera los efectos de los agonistas, en ausencia de antagonista. En conclusión, este compuesto actúa selectivamente sobre el RM₂, comportándose como un PAM de antagonistas y un NAL para agonistas [66].

1.2.4. Señalización dependiente de proteína G

Existen diferencias entre los subtipos de RM respecto de la distribución en los distintos tejidos y órganos, de aspectos farmacológicos y particularmente, difieren respecto de la secuencia del III LIC, es decir, a nivel de la región de interacción de los receptores con la proteína G, dando lugar a dos grupos principales. El primer grupo incluye a los subtipos M₁, M₃ y M₅ los cuales se acoplan y activan preferentemente a las proteínas G_{αq/11} y G_{α12/13} (insensibles a PTX). La activación de PLC por G_{αq/11} promueve la formación de IP₃ y DAG; mientras que la activación de PLD por G_{α12/13} promueve la formación de ácido fosfatídico y colina [54]. Los subtipos M₁, M₃ y M₅ pueden activar la vía de la MAP kinasas a través de la activación de la PKC.

El segundo grupo está representado por los subtipos M₂ y M₄. Estos receptores se acoplan con preferencia a proteínas G_{αi/o} (sensibles a PTX), lo cual resulta en la inhibición de la AC y la consecuente disminución de los niveles de AMPc intracelulares [54, 67, 68]. Sin embargo, la especificidad del RM₂ por la proteína G_{i/o} no es absoluta, ya que RM₂ sobreexpresados en células CHOK1 estimulan la síntesis de AMPc o la acumulación

de fosfoinosítidos a través del acoplamiento con la proteína G_s o $G_{q/11}$, respectivamente [69, 70]. La activación del RM_2 resulta en: a) la inhibición de los canales de Ca^{2+} dependiente de voltaje -tipo L- a través de la activación de la PLC_β ; b) la activación de la cascada de señalización de las MAP kinasas ERK1/2 a través de Ras/rap1GAPII [28, 71], la fosfolipasa A2, PLD y kinasas de tirosina [72]; inhibe la “corriente funny” (I_f) en las células del nodo sinoauricular.

Por otro lado, la subunidad $G\beta\gamma$ también puede participar en la transducción de señales. Mientras que los subtipos M_2 y M_4 pueden activar directamente los canales rectificadores de potasio (GIRK) a través de la subunidad $G\beta\gamma$ de la proteína G_i [72, 73], el RM_1 inhibe esta conductancia [74]. Los subtipos M_1 y M_2 pueden activar a través de la subunidad $G\beta\gamma$ otro grupo de MAP kinasas, JNKs, por una vía dependiente de Ras y Rac1, en células COS-7. Además, el RM_2 se puede acoplar a la vía proteína $G\beta\gamma$ para estimular la fosforilación de ERK1/2 por la PI_3K como parte de un mecanismo que involucra tirosina kinasas, Shc, Grb2, Ras y Raf [71, 75]. La estimulación de RM_2 en miocitos vasculares activa a través de la subunidad $G\beta\gamma$ canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje que, a su vez, estimulan la vía de PI_3K , PKC y c-Src [27].

1.2.5. Señalización independiente de proteína G

Estudios recientes sobre señalización independiente de proteínas G mediada por RM han revelado que los RM acoplados a G_q (particularmente M_1 y M_3) pueden activar la vía de las MAPK en forma dependiente de arrestinas. En algunos casos se ha podido evidenciar, ya sea usando receptores endógenos o sobrexpresados en células heterologas de mamífero (WT o modificados genéticamente), situaciones de selectividad funcional ya sea a favor de la señalización dependiente de proteína G o via arrestina. A modo de ejemplo describiremos uno que revela un rol farmacológico novedoso de un ligando muscarínico clásico.

El agonista pilocarpina es un agente parasimpaticomimético definido tradicionalmente como agonista total o parcial. Recientemente, se demostró que pilocarpina puede actuar sobre RM_3 como agonista sesgado e incluso como antagonista de RM_3 , dependiendo del ambiente celular, los niveles de expresión del receptor, las vías de señalización asociadas a la activación del receptor y las metodologías para monitorear dichas vías de señalización. En células HEK 293T o MIN6, las cuales expresan endógenamente RM_3 , los

agonistas totales convencionales (carbacol, OxoM) activan $[Ca^{2+}]_i$, el cual es consecuencia de la activación de la cascada PLC/IP₃ via G_q. Pilocarpina, en cambio, es incapaz de estimular $[Ca^{2+}]_i$, pero logra bloquear el incremento $[Ca^{2+}]_i$ promovido por carbacol, comportándose como antagonista. En estas mismas células pilocarpina estimula ERK 1/2 via β -arrestina/Src como agonista parcial, con menor eficacia que Oxo-M. En consecuencia, pilocarpina actúa como agonista parcial activando la cascada de ERK1/2 via arrestina y no activa la cascada PLC/IP₃/Ca²⁺ vía G_q, comportándose como un antagonista (Figura 5) [76].

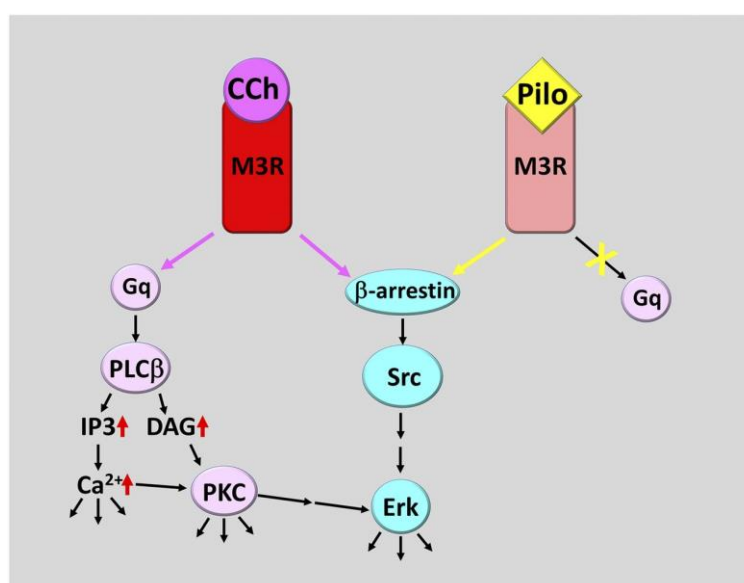


Figura 5: Modelo propuesto para los efectos de carbacol y pilocarpina al activar el RM₃. Cuando carbacol (o cualquier otro agonista muscarínico total, como acetilcolina u OXO-M) o pilocarpina se unen a RM₃, el receptor asume dos conformaciones similares, aunque diferentes. El RM₃ unido a carbacol es capaz de activar G_q, lo cual promueve la estimulación de PLC_β y los subsiguientes pasos de la cascada de señalización. Además, carbacol activa la señalización mediada por β -arrestinas, promoviendo la estimulación de ERK1/2. En contraste, la conformación del RM₃ unido a pilocarpina no facilita la activación de G_q. De hecho, pilocarpina puede antagonizar la señalización dependiente de G_q compitiendo con carbacol. Sin embargo, pilocarpina puede todavía activar la señalización dependiente de β -arrestina que conduce a la fosforilación de ERK1/2. Tomado de Pronin y col., 2017 [76].

1.2.6. Regulación de los receptores muscarínicos

El mecanismo de regulación homóloga, descrito en el punto 1.1.5, presenta características comunes, pero también diferencias de acuerdo a los distintos subtipos. En esta familia de receptores, la desensibilización por agonista depende de la fosforilación del receptor, que ocurre rápidamente a nivel de residuos serina y treonina ubicados en la porción central del III LIC.

En el caso del RM₂, GRK2 (o una kinasa similar) endógena fosforila al receptor activado [57, 77] y este evento está asociado a la desensibilización del receptor activado por agonista [77]. Sin embargo, en cuanto a la especificidad de las GRKs sobreexpresadas, el RM₂ puede ser fosforilado por GRK2 y GRK3 principalmente, lo que perturba el acoplamiento del receptor a la proteína G [78], pero también por GRK5 y GRK6 [77, 79, 80]. En comparación, RM₃ es fosforilado por GRK2, GRK3 y GRK6, pero no por GRK5 [81-83].

En la vía regulatoria clásica de los GPCR, la fosforilación del receptor permite la unión de arrestinas que, a su vez, impide la interacción del receptor con proteínas G (desacople de la proteína G) [84]. En cuanto a los RM, las arrestinas 2 y 3 pueden unirse al RM₂ *in vitro* e *in vivo* [85-87]. En situaciones fisiológicas (sin sobreexpresión de GRK y arrestinas) existe una fuerte correlación entre la capacidad de RM₂ WT y mutantes para unir arrestinas (*in vivo* e *in vitro*) y la capacidad de estos receptores para sufrir desensibilización en células que no sobreexpresen GRK y arrestinas [84, 88]. Por otra parte, la sobreexpresión de Arr-2 o Arr-3, en presencia de GRK2, actúan sinérgicamente, incrementando la desensibilización del RM₂, tanto en líneas celulares como en miocardiocitos auriculares [89, 90]. En células HEK 293, las GRK2, GRK3 y GRK6 endógenas desensibilizan al RM₃ expresado constitutivamente, y tanto Arr-2 como Arr-3 participan en este proceso [81].

Se sabe que todos los subtipos de RM puede ser internalizados a compartimentos intracelulares [91] si bien la velocidad y proporción de receptores internalizados puede variar y depender del tipo celular utilizado. En general, la internalización de los RM requiere la fosforilación del III LIC de los receptores [92]. En el caso de los subtipos M₂-M₅, pero no del M₁, la internalización aumenta cuando se sobreexpresa GRK2 [93]. Por lo otro lado, las GRK4-5 facilitan parcialmente el secuestro del RM₂ y RM₄, a diferencia de los subtipos de M₁, M₃ y M₅, en las mismas células [94]. En el caso del RM₂, la GRK2 y Arr-

2 o Arr-3 también actúan en forma sinérgica estimulando el secuestro y la endocitosis del receptor, ya sea en líneas celulares heterólogas como en miocardiocitos auriculares sobreexpresando estas proteínas regulatorias [89, 90].

En relación a las vías de internalización estudiadas sin sobreexpresión de arrestinas, los subtipos M₁, M₃ y M₄ son internalizados de manera dependiente [95] o independiente [96] de arrestinas, según el autor, y dinamina-dependiente a través de la formación de vesículas recubiertas de clatrina en células HEK 293T [96, 97]. Por otro lado, el RM₂ parece internalizar por una vía independiente de dinamina en el mismo tipo celular [84, 95]. Por otra parte, se ha sugerido que la internalización del RM₂ puede ocurrir por vías dependientes e independientes de arrestina [84]. En células HEK 293T, la internalización del RM₂ es independiente de arrestinas, y no parece ocurrir por la vía dependiente de clatrina o caveola [84, 95, 98]. Sin embargo, la sobreexpresión de Arr-2 o Arr-3 favorece la internalización del RM₂ dependiente de arrestina y clatrina en el mismo tipo celular [84]. Otros autores, en cambio, hallaron que en fibroblastos embrionarios murinos carentes de arrestinas, el RM₂ no logró ser internalizado, sugiriendo una vía normal dependiente. Es interesante notar que la internalización del RM₂ -dependiente de arrestina y clatrina- es la vía preferencial en el corazón cuando se sobreexpresan GRK2 y arrestina-3 [90].

Respecto de la regulación heteróloga de estos receptores, los subtipos M₁ y M₃ pueden ser fosforilados por PKC independientemente de la unión del agonista [83]. En cambio, el RM₂ es preferentemente fosforilado por PKA [79, 99].

1.2.7. *Oligomerización de RM*

El empleo de la metodología de BRET ha permitido obtener evidencias sugiriendo que RM₁, RM₂ y RM₃ expresados individualmente en células heterólogas intactas forman homooligómeros, mientras que la coexpresión de dos subtipos diferentes (en todas las combinaciones posibles) da lugar a la formación de heterooligómeros, en forma constitutiva [100]. En estos estudios se concluyó que los complejos homooligoméricos serían de naturaleza dimérica y se demostró que el agonista no modifica los parámetros de interacción entre los protómeros. Utilizando esta metodología también se demostró que los subtipos M₃ y M₅ forman homo y heterooligómeros [101]. Mediante estudios de FSC otros autores avalaron los datos anteriores, proponiendo que tanto RM₁ y como RM₂ se expresan en la membrana celular como una población homogénea de homodímeros [102]. Estudios de TIRFM discrepan respecto a los estudios anteriores, proponiendo que un 30% de

una población de RM₁ en células CHO se encuentra como homodímeros sin presencia de oligómeros de mayor tamaño, existiendo una rápida y dinámica interconversión entre monómeros y dímeros [103]. Estudios de spIDA mostraron que una población RM₁ está constituida por una mezcla de monómeros y dímeros/oligómeros en una proporción (75:25). El tratamiento con los antagonistas parcialmente selectivos pirenzepina y telenzepina desplaza significativamente el equilibrio en favor del estado dimérico/oligomérico; no así el antagonista no selectivo atropina. De este modo los ligandos muscarínicos poseerían una capacidad selectiva para estabilizar la forma dimérica u oligomérica del receptor [104].

Con respecto al RM₂, un análisis de FRET cuantitativo, demostró que la estequiometría de este subtipo se ajusta preferentemente a un tetrámero [105]. Mediante estudios de unión de ligandos, otros autores confirmaron este hallazgo, revelando que a) la estequiometría biológicamente relevante para su acoplamiento a proteínas G corresponde a un tetrámero [106]; b) la heterogeneidad de sitios en la unión de galamina a RM₂ depletados de proteínas G es coherente con un modelo tetramérico [107].

La metodología de FRET reveló que los RM₃ forman dímeros estables en la membrana plasmática, donde una fracción importante de receptores interactúa de manera dinámica formando tetrámeros [108-110]. Alternativamente, se sugirió que la formación del tetrámero podía ocurrir previo al tráfico hacia la membrana y podía participar del control de calidad celular [109]. En el caso del subtipo M₃, se observó que el estado oligomérico podía ser modificado por la unión de agonista, dependiendo de la metodología de análisis utilizada [110].

1.3. Los GPCR y el Sistema Nervioso Autónomo

El Sistema Nervioso Autónomo (SNA) es la porción del Sistema Nervioso Periférico encargado de controlar las funciones viscerales involuntarias del organismo -tales como la fuerza y la frecuencia de la contracción muscular cardíaca, la contracción y la relajación del músculo liso y la secreción de glándulas exocrinas y endocrinas-, del mantenimiento de la homeostasis interna y de las repuestas de adaptación ante las variaciones del medio externo e interno [111].

El SNA recibe información de diferentes sectores del Sistema Nervioso Central (SNC) que procesan e integran estímulos del organismo y del ambiente externo y contro-

lan su actividad. La actividad eferente del SNA se inicia a partir de centros localizados en la médula espinal, tronco encefálico e hipotálamo. Es un sistema tónicamente activo que mantiene a los tejidos y órganos efectores en un estado de función intermedia. Un anormal funcionamiento del SNA puede provocar diversos síntomas que se agrupan bajo el nombre genérico de disautonomía.

De acuerdo a un criterio anatómico, farmacológico y funcional, el SNA periférico se subdivide en: Sistema Nervioso Simpático (SNS) y Sistema Nervioso Parasimpático (SNP). El SNS prepara al organismo para el gasto de energía, situaciones de emergencia o estrés. En contraste, el SNP se encarga de conservar y almacenar la energía, y se opone a la acción del SNS, restableciendo las condiciones de reposo [111]. La mayoría de los órganos están inervados por ambos sistemas y sus efectos son generalmente antagónicos de tal manera que el resultado final dependerá del balance entre los dos [111].

Los nervios eferentes simpáticos y parasimpáticos están compuestos por una cadena de dos neuronas desde el SNC hasta el órgano donde ejercerá su efecto. La primera neurona tiene origen en el SNC y se conoce como neurona preganglionar. Esta neurona se proyecta a través de una fibra preganglionar para contactar con una neurona localizada en un ganglio autonómico. El axón de esta neurona ganglionar integra una fibra postganglionar que contacta, a su vez, con el órgano efector a través de los terminales nerviosos. Las neuronas preganglionares de los SNS y SNP son colinérgicas y liberan ACh. Este neurotransmisor activa los receptores colinérgicos de tipo nicotínico, presentes a nivel de los cuerpos neuronales ganglionares [111, 112].

A nivel del órgano efector, las respuestas del SNA están mediadas por la activación de receptores autonómicos pertenecientes a la familia de los GPCR. En las sinapsis efectoras del SNS, la noradrenalina (NA) liberada por las fibras postganglionares actúa sobre receptores α y β adrenérgicos ($R\alpha A$ y $R\beta A$). En cuanto al SNP, la ACh liberada por las fibras postganglionares actúa sobre receptores de tipo colinérgico muscarínico (RM).

Tanto los RA como los RM son de particular importancia para el funcionamiento del corazón dado que participan de la regulación homeostática del sistema cardiovascular. El corazón se encuentra inervado tanto por la rama simpática como por la rama parasimpática (nervio vago). En el músculo cardíaco, los $R\beta A$ predominantes son el $R\beta_1 A$ y el $R\beta_2 A$ y, en contraste, existe una pequeña proporción de $R\alpha A$ en una relación $\beta:\alpha$ de 10 a 1 [16, 72]. El $R\beta_1 A$ es el principal RA cardíaco (75-80%) y está expresado en los nodos sinoauricular y aurículo-ventricular así como en la aurícula y el ventrículo [111]. Por otra

parte, el RM predominante en el miocardio es el subtipo M_2 [72] y se encuentra mayoritariamente expresado en el nodo sinoauricular, nodo aurículo-ventricular y aurícula y, en menor medida, en el ventrículo. Ambos receptores participan en la regulación de la función cardíaca mediando efectos antagónicos sobre la misma [111].

Con respecto a la regulación cardiovascular, la activación de los $R\beta_1A$ por NA incrementa la frecuencia cardíaca (FC) (efecto cronotrópico positivo), la contractilidad cardíaca (efecto inotrópico positivo), incrementa la velocidad de conducción (efecto dromotrópico positivo) e incrementa la velocidad de relajación. Por otro lado, la activación de los RM_2 por ACh inhibe la FC hasta valores normales (efecto cronotrópico negativo), inhibe la velocidad de conducción (efecto dromotrópico negativo). Además, la activación de los RM_2 reduce la contractilidad de los miocardiocitos en la aurícula (efecto inotrópico negativo).

1.3.1. Rol de la señalización mediada por receptores autonómicos en la fisiología cardíaca

Si bien no es el foco de este trabajo presentar una descripción detallada de los mecanismos bioquímicos involucrados en la función cardíaca, destacaremos algunos conceptos básicos sobre las vías de transducción de señales que participan en la regulación simpática y parasimpática de la función cardíaca:

a) Por un lado, *la estimulación simpática* activa los $R\beta_1A$ causando la activación de la AC vía $G\alpha_s$ con el consecuente incremento de los niveles intracelulares de AMPc. El AMPc, por un lado, regula la actividad de canales activados por nucleótidos cíclicos y, por otro lado, estimula la actividad de la PKA que, a su vez, fosforila numerosos sustrato involucrados en la respuesta contráctil como el receptor de rianodina, canales de Ca^{2+} tipo L, la proteína fosfolamban del RE y la maquinaria contráctil. Además, el AMPc se une directamente a los canales iónicos responsables de la corriente I_f , trayendo como consecuencia el incremento de la FC y la contractilidad cardíaca [111, 113].

b) Por otra parte, *la estimulación vagal parasimpática*, activa los RM_2 cardíacos causando la inhibición de la AC vía $G\alpha_{i/o}$, resultando en la disminución de los niveles intracelulares de AMPc y de la actividad de PKA. Estos efectos conducen a la reducción de la corriente de despolarización a través de los canales activados por AMPc y los canales de Ca^{2+} tipo "L" trayendo como consecuencia una disminución en la fuerza de contracción. Además, la

subunidad $G\beta\gamma$ activa la corriente rectificadora de los canales de potasio (GIRK), resultando en la hiperpolarización de la membrana, la disminución de la velocidad de conducción a través del nodo sinoauricular y una reducción en la frecuencia cardíaca [72, 111, 113, 114].

1.4. Regulación autonómica de la fisiología cardíaca

El SNA inerva el corazón y los vasos por medio de un mecanismo integrado en el que intervienen el SNS y el SNP, denominado *arco reflejo baroreceptor* [115]. Este mecanismo interconectado mantiene, a través de múltiples reacciones instantáneas de estimulación-inhibición, un tono cardiovascular estable que determina los valores normales de presión arterial, frecuencia cardíaca, retorno venoso, estado contráctil y de distensibilidad cardíaca en distintas circunstancias de la actividad diaria (reposo, ejercicio, estrés, etc).

El arco reflejo baroreceptor incluye los corpúsculos barorreceptores (CBR) (concentrados en el seno carotídeo y el arco aórtico), los pares craneales IX y X (vías aferentes autónomas), el centro vasomotor bulbar, la vía eferente simpática y parasimpática, los vasos sanguíneos con sus receptores, las vías aferentes somáticas y autónomas y; el corazón que participa tanto con su sistema excito-conductor como con sus fibras musculares.

Los CBR detectan la presión intravascular y transmiten esa información al centro vasomotor bulbar (CVMB) a través de las vías aferentes autónomas (pares craneales IX y X). El CVMB posee a) un área simpático-excitatoria y cardio-aceleradora que, a través de sus correspondientes vías eferentes, provoca taquicardia y vasoconstricción b) un área simpático-inhibitoria o cardiodepresora, que a través de sus vías eferentes genera bradicardia y vasodilatación. El nervio vago (par craneal X) es la vía eferente que llega al nódulo sinusal, donde su estímulo genera bradicardia. Su inhibición genera taquicardia, al dejar sin contrarrestar el efecto de las fibras simpáticas eferentes que inducen un aumento de FC y vasoconstricción [116].

1.5. Monitoreo de la expresión y la función de GPCR en tiempo real, en células vivas

Las interacciones proteína-proteína son un prerequisite en la mayoría de los procesos celulares. En los GPCR, la relevancia de la interacción entre receptores (homo o heterooligomerización) así como la interacción del receptor con otras proteínas (intracelulares) radica en su participación en procesos tan importantes como la expresión, activación,

señalización y regulación de receptores, entre otros. Las metodologías que permiten estudiar estos procesos son una herramienta prometedora para dilucidar los mecanismos que intervienen en los mismos. Por lo tanto, la comprensión y control farmacológico de dichas interacciones ofrecen un blanco para la intervención terapéutica en una gran variedad de enfermedades asociadas a los GPCR.

1.5.1. BRET para el monitoreo de interacciones proteína-proteína en tiempo real.

La metodología de *BRET* es un fenómeno biofísico que propone una estrategia “no invasiva” basada en la proximidad entre las moléculas interactuantes y ofrece la ventaja de poder analizar en tiempo real las interacciones entre proteínas en su correcto lugar, en células vivas [53]. Este método es una poderosa herramienta utilizada para evaluar interacciones entre receptores de la familia de los GPCR (homo y heterooligomerización), para monitorear cambios conformacionales dentro de una misma proteína o complejo oligomérico (receptor/proteína G) y, para analizar la interacción entre un GPCR y proteínas que regulan la función del receptor, tales como arrestinas, proteínas kinasas y factores involucrados en cascadas de señalización.

La metodología de *BRET* se basa en el fenómeno de transferencia de energía no radiativa en resonancia (RET) entre una molécula dadora de energía y otra aceptora de energía a través un mecanismo formulado matemáticamente por Förster [117]. Es decir, la molécula dadora en su estado electrónico excitado transfiere parte de su energía a una molécula aceptora (generalmente una proteína fluorescente), mediante una interacción entre dipolos. Dicha transferencia de energía depende principalmente de: a) un solapamiento entre el espectro de emisión del dador y el espectro de excitación del aceptor; b) la cercanía entre las moléculas dadora y aceptora y; c) la orientación relativa entre dador y aceptor. La eficiencia de la RET es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia (d) entre los dipolos de las especies dadora y aceptora [53]. Por lo tanto, la transferencia de energía entre las moléculas aceptora y dadora sólo ocurre cuando existe una interacción entre ambas ($d < 100 \text{ \AA}$) congruente con la formación de complejos proteicos macromoleculares. Esto permite que las metodologías basadas en RET resulten apropiadas para evaluar interacciones proteína-proteína [118, 119].

Cuando la proteína dadora es una proteína fluorescente la metodología recibe la denominación de FRET. En cambio, si la proteína dadora es una luciferasa (proteína capaz

de generar radiación bioluminiscente al catalizar la oxidación de un sustrato adecuado), el método se denomina BRET.

La versión clásica de BRET (BRET¹) [120] requiere la construcción de dos proteínas de fusión a partir de las dos proteínas (P1 y P2) cuya interacción se desea evaluar. P1 es fusionada a la Luciferasa de *Renilla* (RLuc), generando la proteína de fusión P1-RLuc, mientras P2 es fusionada a una proteína aceptora de energía, la proteína fluorescente amarilla (YFP), generando la proteína de fusión P2-YFP. Cuando ambas proteínas son expresadas en una célula y P1-RLuc no interacciona con P2-YFP, puede detectarse por luminometría una señal de emisión bioluminiscente producto de la oxidación del sustrato celenteracina h a celentaramida catalizada por P1-RLuc, registrándose un pico de emisión a ~ 480 nm. En cambio, si P1-RLuc interacciona con P2-YFP, parte de la energía de oxidación generada por el dador es transferida a la YFP, lo cual promueve la emisión adicional de energía fluorescente, detectada como un pico de luz adicional a ~ 530 nm. En la figura 6 puede observarse la representación esquemática del empleo de la metodología de BRET para monitorear interacciones entre proteínas.

Las principales ventajas de la metodología de BRET son: a) la proteína dadora de energía no requiere excitación exógena, b) la cuantificación de la transferencia de energía mediante luminometría es sencilla c) los niveles relativos de expresión de las proteínas de fusión pueden ser medidos independientemente, monitoreando la luminiscencia y fluorescencia del dador y el aceptor, respectivamente [119].

A lo largo de este trabajo se utilizaron dos sistemas de BRET¹. Para estudiar la modulación de la interacción receptor/receptor entre receptores muscarínicos M₂ (RM₂), se prepararon dos proteínas de fusión, fusionando el RM₂ a RLuc o YFP en su extremo C-terminal (Sistema BRET^{1A}: RM₂-RLuc y RM₂-YFP). Para evaluar la interacción entre el RM₂ y arrestina-2 (Arr-2) se utilizó la proteína de fusión RM₂-RLuc mencionada anteriormente y se construyó la proteína Arr-2 fusionada a YFP (sistema BRET^{1B}: RM₂-RLuc y Arr-2-YFP). En ambos sistemas, las proteínas de fusión fueron expresados transitoriamente en células HEK 293T y se determinó la señal BRET en presencia de celenteracina h, por luminometría.

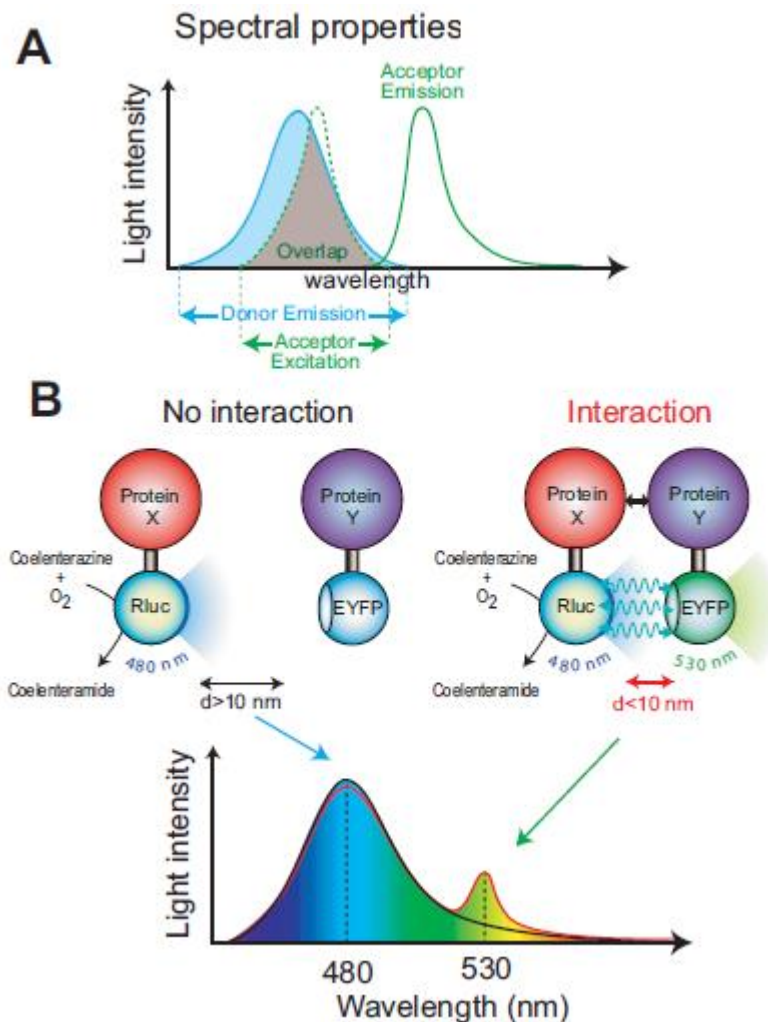


Figura 6. Principio de la metodología BRET. (Panel A). Para que exista transferencia de energía entre la molécula dadora de energía (RLuc) y la molécula aceptora de energía (YFP), el espectro de emisión del donador debe estar superpuesto con el espectro de excitación del aceptor. (Panel B). Para estudiar la interacción entre dos proteínas, la proteína 1 (X) es fusionada a la luciferasa de *Renilla* (RLuc) y la proteína 2 (Y) es fusionada a una proteína amarilla fluorescente (YFP). La reacción es iniciada por la adición del sustrato de luciferasa, celenteracina h. Si la distancia entre la proteína 1 y la proteína 2 es mayor a 100 Å ($d > 10$ nm), se emite una radiación con un pico a 480 nm (sin interacción). Si la distancia entre la proteína 1 y la proteína 2 es menor a 100 Å ($d < 10$ nm), la energía se transfiere desde la luciferasa a la proteína YFP, resultando en una señal adicional emitida por el YFP (interacción).

1.5.2. Ensayo funcional para el monitoreo de la señalización acoplada a proteínas G.

Los ensayos con capacidad para monitorear la transducción de señales a través de la activación de GPCR siguen siendo de gran importancia, tanto en la investigación básica como en los procesos de descubrimiento de nuevas drogas.

Una de las metodologías más utilizadas para monitorear la señalización mediada por GPCRs consiste en detectar y cuantificar la activación de una proteína G con capacidad para acoplarse a PLC β , a través de la valoración del incremento en la concentración del ión Ca $^{2+}$ intracelular ([Ca $^{2+}$] $_i$) (ver sección 1.1.3.1). Con este fin, se ha diseñado un ensayo luminométrico constituido por: 1) el GPCR en estudio, 2) una proteína G con actividad G $_q$; 3) la proteína bioluminiscente acuorina [121, 122].

Originalmente, este ensayo utilizaba un sistema de transducción compuesto por una proteína G $_q$ y un GPCR capaz de acoplarse a la vía G $_q$ /PLC β /Ca $^{2+}$. Sin embargo, es posible modificarlo a los fines de evaluar la respuesta a la activación de un receptor acoplado a proteína G $_i$, reemplazando G $_q$ por una proteína quimera G α_{qi} . Una proteína quimera frecuentemente utilizada es G α_{qi5} , generada por Conklin y col, quienes reemplazaron 5 aminoácidos del extremo C-terminal de G α_q por los correspondientes residuos de G α_i . La nueva proteína quimera demostró capacidad para estimular la actividad de la PLC β en receptores activados por agonistas que tradicionalmente se acoplan exclusivamente a proteína G α_i [123]. Se ha estudiado la señalización de diferentes GPCR a través del uso de la quimera G α_{qi5} . Por ejemplo, se demostró la capacidad del RM $_2$ (que señala preferentemente a través de la vía G α_i) para acoplarse a la proteína G α_{qi5} y señalizar a través de la vía de la PLC, con la consecuente hidrólisis de fosfoinosítidos [124].

Por otra parte, el sistema luminométrico requiere la presencia de una proteína capaz de detectar los cambios [Ca $^{2+}$] $_i$. La acuorina es un complejo proteico bioluminiscente aislado del organismo marino *Aequorea victoria*, compuesto por una fotoproteína de 21 KDa denominada apoacuorina unida covalentemente al grupo prostético hidrofóbico, celenteracina. La unión de la acuorina a iones calcio induce un cambio conformacional que resulta en la oxidación del cofactor cromóforo celenteracina h obteniéndose como productos la apoacuorina, celentaramida, CO $_2$ y luz con un pico de emisión a $\lambda_{max} \sim 470$ nm que se detecta mediante luminometría (Figura 7) [125, 126].

Este *sistema bioluminiscente* presenta varias ventajas respecto de las clásicas técnicas que utilizan marcadores fluorescentes para medir los cambios en los niveles intracelulares

de Ca^{2+} (como fura-2, indo-1, entre otros): 1) la apocuorina se puede expresar de manera transitoria o estable en una amplia gama de tipos celulares; 2) por medio de ingeniería genética se puede determinar la localización intracelular de la apocuorina y, por lo tanto, estudiar los flujos de calcio compartimento-específicos; lo cual resulta ventajoso frente a los marcadores fluorescentes que no muestran una localización selectiva [127]; 3) la acuorina no perturba las células, no es tóxica, no se une a otros iones divalentes, no existe pérdida o fuga celular de la misma y es fácilmente adaptable a un formato de placa de 96 pocillos [127, 128]; 4) la señal de luminiscencia se origina exclusivamente de células transfectadas, lo cual conduce a una alta relación señal/fondo y; por último, 5) no requiere excitación externa ni el uso de instrumentos complejos y costosos, como los microscopios de fluorescencia.

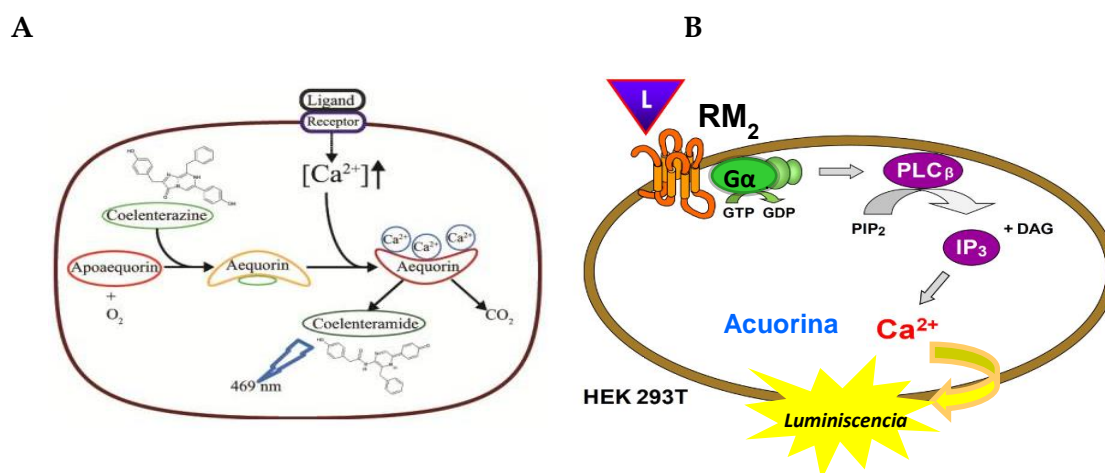


Figura 7. Ensayo bioluminiscente de acuorina: mecanismo de emisión de luz por acuorina al unirse al ión Ca^{2+} . (Panel A). Ensayo general: La apocuorina transfectada transitoriamente se une al grupo prostético celenteracina para formar acuorina (con capacidad de unión de 3 iones Ca^{2+}). La activación de un GPCR por ligando causa un incremento transitorio de los niveles de Ca^{2+} intracelular. Consecuentemente, la acuorina, en presencia de iones Ca^{2+} , cataliza la oxidación de coelenteracina en CO_2 y un producto excitado, coelenteramida, que emite luz a ~ 470 nm. Tomado de Kanchiswamy y col., 2014 [129]. (Panel B). Ensayo adaptado: Células HEK 293T son transfectadas transitoriamente con apocuorina, G_{q15} y RM_2 . La estimulación del receptor por agonista resulta en la disociación de la proteína quimera G_{q15} heterotrimérica en las subunidades $G_{\alpha_{q15}}$ y $G_{\beta\gamma}$. Luego, $G_{\alpha_{q15}}$ activa un PLC_{β} , cuya actividad genera IP_3 . Este 2do mensajero interacciona con su receptor en el RE, promoviendo un eflujo transitorio de Ca^{2+} hacia el citosol. Cuando el Ca^{2+} se une a la acuorina (apocuorina unida a celenteracina), ésta emite luz (fotones) que puede ser detectada por luminiscencia.

En este trabajo de tesis se utilizó un ensayo luminométrico de alta sensibilidad que involucra la coexpresión en células HEK 293T de: a) el RM₂ fusionado al epitope FLAG en su extremo N-terminal (FLAG-RM₂); b) Proteína G α_{q15} recombinante y c) apoacuorina (ApoAc). En presencia del cofactor cromóforo celenteracina h apoacuorina genera la proteína conjugada acuorina, que es capaz de emitir bioluminiscencia al producirse un incremento de la [Ca²⁺]_i [122, 130]. En la figura 7 se detalla el ensayo bioluminiscente.

1.6. Enfermedad de Chagas

1.6.1. Generalidades

En 1909, el médico e investigador brasileño Carlos Chagas descubrió la tripanosomiasis americana, comúnmente conocida como enfermedad de Chagas. Esta enfermedad es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Se calcula que hay entre 6 a 7 millones de personas infectadas por *T. cruzi* en el mundo, con 41.200 nuevos casos cada año debido a transmisión vectorial y 12.500 muertes anuales asociadas a esta infección. Se estima que alrededor de 28 millones de personas están expuestos a contraerla [131-135]. La enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en 21 países de América Latina, teniendo mayor prevalencia en las regiones rurales más pobres de América Central y del Sur [134, 135]. Sólo en Argentina encontramos 1,5 millones de infectados. En las últimas décadas, el perfil epidemiológico ha cambiado debido a los movimientos migratorios entre América Latina y el resto del mundo; trayendo como consecuencia la urbanización y globalización de la enfermedad [135, 136].

1.6.2. Transmisión

En América Latina, el parásito se transmite a los seres humanos principalmente por las heces u orina de los insectos hemípteros hematófagos de la subfamilia *Triatominae*, comúnmente conocidos como vinchucas, chinches o con otros nombres, según la zona geográfica. En Argentina, el vector más común es el *Triatoma infestans*. Este insecto suele vivir en las grietas, paredes de barro y techos de paja de casas precarias de zonas rurales y suburbanas. Normalmente, permanecen ocultos durante el día y por la noche entran en actividad alimentándose de sangre humana. En general, pican en una zona expuesta de la

piel y defecan cerca de la picadura. Los parásitos penetran en el organismo cuando la persona picada se frota instintivamente y empuja las heces o la orina hacia la picadura, los ojos, la boca o alguna lesión cutánea abierta [133, 134].

Por otro lado, el *T. cruzi* también puede transmitirse por la transfusión de sangre infectada (20% de los casos); por el trasplante de órganos provenientes de una persona infectada; por transmisión transplacentaria de la madre infectada a su hijo durante el embarazo o el parto (transmisión congénita) (1% de los casos); por consumo de alimentos contaminados por parásito y; por accidentes de laboratorio.

1.6.3. Diagnóstico

El diagnóstico de certeza de infección por *T. cruzi* durante la etapa aguda se basa en la detección del parásito. Esto se realiza mediante métodos directos o indirectos. En los métodos directos más comunes (también denominados parasitológicos), tales como el micrométodo y la técnica de Strout, se concentra una muestra de sangre mediante centrifugación y luego se detecta la presencia del parásito intacto por observación microscópica. El método indirecto de elección en la actualidad se basa en la detección de fragmentos de ADN del parásito mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el cual puede resultar positivo incluso durante el transcurso de la etapa crónica (cuando la parasitemia es habitualmente indetectable), debido a su elevada sensibilidad.

Ante la sospecha de infección aguda por *T. cruzi* también se utiliza un método indirecto (inmunoserológico) con el objeto de detectar anticuerpos anti-*T. cruzi* circulantes. Si bien la detección de anticuerpos IgG específicos puede resultar negativa en caso de una primoinfección, suele ser positiva en casos de reinfección.

El diagnóstico de la fase crónica de la infección por *T. cruzi* se confirma al demostrar la respuesta inmunológica del huésped frente al parásito. Para ello, se practican reacciones inmunoserológicas normalizadas contra fracciones antigénicas diferentes, que detectan anticuerpos IgG circulantes contra el parásito. Las pruebas utilizadas son: Enzimoinmunoensayo (ELISA), Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), Hemaglutinación Indirecta (HAI) o Aglutinación con partículas de gelatina. Se considera seropositivo para enfermedad de Chagas a aquel paciente que presente seroreactividad para *T. cruzi* en al menos dos técnicas serológicas. En el caso de resultados discordantes es necesario realizar una tercera prueba confirmatoria. Los datos aportados por las pruebas serológicas deben

evaluarse en conjunto con la historia clínica y los antecedentes endémicos-epidemiológicos del paciente [132, 137, 138].

1.6.4. Clasificación de la Enfermedad de Chagas: Aspectos clínicos

La tripanosomiasis americana cursa con dos fases bien diferenciadas, una fase aguda y una fase crónica. Esta última puede manifestarse con patología demostrable o sin patología demostrable (ex período indeterminado), ver (Tabla 1) [139].

La *fase aguda* se inicia al adquirir la infección por cualquiera de las vías de transmisión mencionadas anteriormente (sección 1.1.2.2) y dura entre 30 y 90 días. La subpoblación de pacientes agudos representa menos del 1% respecto del total de individuos infectados. En ellos se detecta elevada parasitemia y, en la mayoría de los casos, los síntomas están ausentes o son leves e inespecíficos. Algunos de los síntomas inespecíficos son fiebre, dolor de cabeza, náuseas, diarrea o vómitos, agrandamiento de ganglios linfáticos, palidez, dolor muscular, abdominal o torácico y; dificultad para respirar. Las expresiones clínicas graves y poco frecuentes de la fase aguda son miocarditis y meningoencefalitis. Habitualmente, las manifestaciones agudas de la enfermedad remiten de manera espontánea y dan paso a la fase crónica [138, 139].

Tabla 1. Clasificación clínica de la enfermedad de Chagas-Mazza.

Agudo	Vectorial	Congénito	Transfusional	Transplante/Vía oral/ Accidentes de Laboratorio
Crónico	<i>Sin patología demostrable (ex indeterminado)</i>			
	<i>Con patología demostrable</i>		Cardiológica	A:Arritmias
				B: Insuficiencia Cardíaca
			Digestiva	Megavísceras
			Neurológica	Disautonomía
				ACV
			Alteraciones SNP	

ACV: accidente cerebrovascular, Alteraciones SNP: sistema nervioso periférico. Tomado de Mitelman, 2011 [139].

La *fase crónica sin patología demostrable* incluye el 70 a 80% de los infectados. Es la etapa preclínica, asintomática y con serología positiva para Chagas, pudiendo ésta

persistir durante toda la vida del paciente. No presenta compromiso orgánico demostrable, es decir, que tanto el examen físico, como los estudios complementarios cardiológicos o gastroenterológicos son normales de acuerdo a lo establecido para cada práctica.

Por otra parte, la *fase crónica con patología demostrable* incluye un 20 a un 30 % de los afectados por esta enfermedad y se caracteriza por una lenta evolución hacia cuadros crónicos sintomáticos asociados a trastornos cardíacos y, en menor medida, a alteraciones digestivas y/o del sistema nervioso central y periférico que se presentan varios años después de la primoinfección [140, 141]. Durante esta fase la presencia de parásitos es rara y cursa con disfunción autonómica, microinflamaciones y fibrosis, produciendo lesiones irreversibles en los órganos blanco, tales como el corazón, esófago, colon y sistema nervioso periférico.

1.6.4.1. Alteraciones cardiovasculares

En la infección chagásica, los cambios patológicos subyacentes que determinan las manifestaciones clínicas y funcionales son las lesiones inflamatorias y degenerativas y fibrosis de las estructuras afectadas que se producen con intensidad variable y progresan gradualmente desde un patrón agudo a un patrón crónico [132]. En el corazón, las estructuras principalmente afectadas son el miocardio auricular y ventricular; el tejido especializado en la excitación y conducción eléctrica afectando a su vez las propiedades eléctricas y mecánicas de los nodos sinoauricular y aurículo-ventricular (A-V) y del sistema conductor intraventricular; la red neuronal intrínseca; la innervación autonómica postganglionar; los receptores celulares autonómicos y; la microcirculación coronaria [132, 140, 142, 143].

El paciente con manifestaciones cardiovasculares crónicas presenta signos y síntomas característicos que surgen del interrogatorio del paciente o del examen físico [139]. Los estudios complementarios permiten descartar o bien confirmar la presunción de lesión orgánica. Básicamente se utilizan: Electrocardiograma (ECG) de 12 derivaciones; Radiografía (Rx) de Tórax y Ecocardiograma bidimensional Doppler. Ante la presencia de signos, síntomas o hallazgo de anomalías en los estudios básicos compatibles con lesión cardíaca, se solicitan estudios adicionales, tales como *Holter*, Prueba ergométrica graduada (PEG) y estudios electrofisiológicos, entre otros.

De acuerdo a Rosenbaum y col, los pacientes chagásicos cardiopatas pueden clasificarse en diferentes grupos, según un criterio de progresión de la enfermedad [144-146]:

Grupo I) Pacientes asintomáticos con serología positiva, ECG normal, Rx de tórax con un índice cardiotorácico (IC) <50%, ecocardiograma normal, PEG normal y *holter* de 24 horas normal (este grupo estaría comprendido en la etapa crónica sin patología demostrable).

Grupo II) Pacientes con compromiso eléctrico exclusivo o dominante. Rx de tórax con IC<50% y ecocardiograma normal. Evidencias en el ECG, PEG o *Holter* de disfunción sinusal, trastornos de conducción, y/o arritmias ventriculares.

Grupo III) Pacientes con cardiomegalia y/o alteraciones de la motilidad parietal, sin síntomas de insuficiencia cardíaca.

Grupo IV) Pacientes con cardiomegalia y síntomas de insuficiencia cardíaca. Presentan una fracción de eyección menor del 40%, alteraciones de la motilidad parietal y/o aneurisma apical.

Además, se detectan trastornos en la conducción que involucran la conducción intraventricular y la conducción A-V. Por otro lado, también se observan trastornos del ritmo cardíaco como arritmias auriculares (extrasístoles auriculares, disfunción del nodo sinusal, entre otras) y ventriculares (extrasístoles ventriculares y taquicardia) [139].

1.6.4.2. Trastornos digestivos

Menos del 10% de los pacientes infectados (o aprox. 1/3 de los pacientes sintomáticos) sufre alteraciones motoras en el tracto gastrointestinal, principalmente acalasia esofágica (con o sin megaesófago) y megacolon. Otros trastornos motores menos frecuentes comprometen al intestino delgado y la vesícula biliar.

La acalasia esofágica se define como un desorden motor caracterizado por una anormal relajación del esfínter esofágico inferior y ausencia de peristaltismo en el cuerpo del esófago (evaluado por una manometría esofágica). Con el tiempo aparece disfagia, dolor y regurgitación [147, 148]. El megacolon chagásico se caracteriza por disfunción motora de segmentos del colon, preferentemente sigmoides y recto, y por denervación parasimpática intramural originando una dilatación y/o elongación del segmento comprometido. Se observan irregularidades en la relajación del esfínter interno en

respuesta a la distensión rectal [149]. La expresión clínica básica del megacolon es la constipación progresiva con dificultad para la evacuación [150].

1.6.5. Tratamiento

A pesar de que el genoma del *T. cruzi* ha sido descifrado en 2005 [151], todavía no existen vacunas ni drogas disponibles para la prevención de la enfermedad. Existe un tratamiento etiológico tripanocida cuyo objetivo es prevenir lesiones viscerales y/o disminuir la probabilidad de progresión de la lesión establecida y la posibilidad de transmisión del *T. cruzi* por todas sus vías. La administración temprana del tratamiento tripanocida mejora el pronóstico. Los medicamentos tripanocidas utilizados para tratar la infección por *T. cruzi* son el Benznidazol y el Nifurtimox [134, 135].

En la fase crónica con patología demostrable es necesario administrar tratamientos sintomáticos específicos para las manifestaciones cardíacas y/o digestivas [140]. El tratamiento de la miocardiopatía chagásica sigue las recomendaciones típicas para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca característica en otras condiciones clínicas. En el caso de arritmias y trastornos de conducción se opta por el tratamiento utilizado para trastornos análogos de diferente etiología y; el mismo criterio se utiliza para el tratamiento farmacológico o quirúrgico de los trastornos esófago-gastro-intestinales [136, 152].

1.6.6. Control y prevención

Debido a que no existe vacuna contra la enfermedad de Chagas la estrategia más eficaz para prevenirla en América Latina es el control vectorial que consiste en eliminar la transmisión y lograr que la población infectada y enferma, principalmente embarazadas y niños, tenga acceso temprano a la asistencia sanitaria. Por otra parte, el cribado de la sangre donada en los países endémicos es necesario para prevenir la infección por transfusiones sanguíneas y donación de órganos [134, 135].

1.6.7. Disautonomía o síndrome disautonómico en la Enfermedad de Chagas

Durante el curso de la enfermedad de Chagas se detectan alteraciones histopatológicas y funcionales en el SNA de los pacientes, particularmente en la etapa crónica. Estas alteraciones afectan principalmente la rama parasimpática que regula la fisiología cardiovascular y digestiva, y se presentan en diferente grado en las formas aguda y crónica de la

enfermedad, así como en las correspondientes formas de infección experimental por *Trypanosoma cruzi* en diferentes modelos animales [132, 136].

1.6.7.1. Alteraciones histopatológicas

Las lesiones histopatológicas del SNA se observan mejor durante la fase aguda. En la miocarditis aguda grave existen células inflamatorias mononucleares agrupadas en torno a los ganglios parasimpáticos cardíacos e infiltran su interior en forma difusa. Pueden aparecer amastigotes dentro de los macrófagos o células satélite. La degeneración de las ganlioneuronas se traduce en la pérdida de basofilia citoplasmática, condensación del citoplasma, tumefacción o vacuolización, necrosis lítica, picnosis nuclear y neuronofagia. La gravedad de las lesiones guarda relación con la intensidad del proceso inflamatorio y el parasitismo. También se observan lesiones en los nervios cardíacos simpáticos y parasimpáticos, así como infiltración y lisis focal. Las pruebas bioquímicas muestran una marcada reducción de ACh y NA en el miocardio durante la infección aguda. Estos niveles se normalizan con el tiempo. Estos hallazgos indican que durante la infección aguda puede haber destrucción de nervios simpáticos y parasimpáticos, y que luego, habría reinervación [153, 154].

Las lesiones que se observan durante la fase crónica consisten en una periganglionitis e intraganglionitis leve, fibrosis capsular intersticial, proliferación de células satélite y pérdida total o parcial de neuronas. Rara vez se detectan parásitos en las estructuras ganglionares [153, 154].

1.6.7.2. Alteraciones funcionales

Como correlato de las lesiones inflamatorias y la destrucción ganglionar en el SNA cardíaco, también se han podido evidenciar alteraciones en la regulación autonómica de la función cardiovascular en los pacientes chagásicos (disautonomía). Esta disfunción puede evidenciarse mediante pruebas que detectan la incapacidad del sistema cardiovascular para regular la FC y la presión arterial (PA) en comparación con la población sana, cuando el paciente es sometido a estímulos farmacológicos y fisiológicos estandarizados [132, 155, 156]. Se ha concluido que estas pruebas son anormales en aprox. un 30 % de los pacientes chagásicos crónicos [157]. Algunas de las pruebas funcionales más frecuentemente utilizadas son:

- a) *Prueba ortostática ("Tilt test")*: se analizan los cambios en la FC y de la PA al pasar de la posición decúbito supino a la posición erecta [157]. Se calcula el cociente entre los intervalos R-R del ECG entre los latidos 30 y 15 (relación 30:15). El mismo debe ser mayor o igual a 1,1. Los pacientes chagásicos que padecen disfunción parasimpática (cardio-vagal) exhiben una relación 30:15 menor a la normal.
- b) *Maniobra de Valsalva*: esta prueba consta de cuatro fases que permiten evaluar los cambios en la PA y en la FC mientras se realiza un esfuerzo respiratorio contra una presión de 40 mm Hg durante 20 seg [157]. Durante la prueba se determina la relación de Valsalva (Rv) cuyo valor normal es igual o superior a 1,5 [158]. La mayor parte de los estudios coincide que los pacientes chagásicos presentan valores de Rv inferiores a los normales [143].
- c) *Prueba de Hiperventilación*: se estudian los cambios en la PA y FC antes, durante y después de respirar profunda y rápidamente durante 15 s [157]. Los pacientes chagásicos presentan un menor descenso de la PA y un mayor tiempo de recuperación de la misma respecto a los individuos no infectados controles. Estas alteraciones sugieren una disfunción de la rama simpática del SNA que regula la vasoconstricción de las arteriolas [143].
- d) *Prueba del reflejo de la tos*: se analizan los cambios de la FC inducidos por un acceso de 3 golpes de tos, registrando el intervalo R-R antes y después de toser. La respuesta normal se debe a una descarga simpática [157]. En los pacientes chagásicos el incremento de FC puede disminuir dramáticamente, en comparación con los individuos controles, lo cual sugiere un daño en la inervación simpática del nódulo sinoauricular [143].
- e) *Análisis de la variabilidad de la frecuencia cardíaca* (en inglés, HRV): esta metodología permite detectar alteraciones en las variaciones periódicas de la FC, las cuales constituyen indicadores de disfunción autonómica de mayor sensibilidad, en comparación con las pruebas funcionales. En su variante tradicional, se efectúa un monitoreo de la FC mediante ECG (*Holter*) durante 24 horas [159]. El análisis del poder espectral de la HRV permite calcular la relación LF/HF, donde LF es un marcador probable de actividad simpática, aunque según algunos autores sugieren que puede estar afectado por la actividad vagal, mientras que HF depende únicamente de la actividad vagal. En particular una disminución en el índice HF de la HRV es indicador de disfunción parasimpática (inhibición vagal). Los pacientes chagásicos disautonómicos exhiben

frecuentemente una reducción en este índice, respecto a los valores normales, indicando una alteración de la rama parasimpática [160].

1.6.8. *Teorías sobre la fisiopatología de la enfermedad de Chagas*

En las últimas décadas se describieron cuatro posibles mecanismos patogénicos para explicar el desarrollo de la miocardiopatía chagásica, a partir de la evidencia recopilada en estudios tanto en modelos animales como en humanos: a) Daño parasitario directo, b) Teoría microvascular, c) Teoría neurogénica (disautonomía) y; d) Teoría inmunológica [132, 142, 155, 156].

a) *Daño parasitario directo*: la miocardiopatía chagásica es en esencia una miocarditis. Si bien el proceso inflamatorio es más notable en la fase aguda, clínicamente es silencioso pero persistente en la fase indeterminada y crónica de la enfermedad como fue demostrado en modelos experimentales, en necropsias y biopsias. Inicialmente, estudios patológicos de la fase aguda mostraban alta parasitemia en tejido cardíaco y digestivo mientras que en la fase crónica la presencia de parásito en los órganos blanco era escasa. Posteriormente, el uso de técnicas más sensibles, como la inmunohistoquímica, la reacción en cadena de la polimerasa e hibridización *in situ*, permitieron demostrar la presencia de antígenos de *T. cruzi* y material genómico en los focos inflamatorios de pacientes en la fase crónica de la enfermedad. Estas observaciones renovaron el foco del rol patogénico del daño miocárdico dependiente de la presencia del parásito en los tejidos huésped [155].

b) *Teoría microvascular*: evidencia basada en datos patológicos, experimentales y clínicos sugieren que las alteraciones funcionales y estructurales en la microcirculación coronaria favorecen la isquemia miocárdica que podría contribuir a la patogénesis de la enfermedad cardíaca de Chagas, probablemente por mecanismos inflamatorios. Entre las irregularidades microvasculares observadas, se puede mencionar: inflamación perivascular, colapso de arteriolas intramiocárdicas, lisis de miocitos, engrosamiento de la membrana basal de capilares, vasodilatación y vasoconstricción anormal a nivel microcirculatorio e incremento de la actividad plaquetaria, las cuales en su conjunto determinan isquemia y daño focal miocárdico. Por otro lado, se ha postulado que la ocurrencia de microinfartos se debe a una sobreestimulación de la rama simpática, vinculando de esta forma las hipótesis microvascular y neurogénica para describir la fisiopatología chagásica [155, 161].

c) *Teoría neurogénica*: estudios pioneros de Koeberle demostraron que corazones de los pacientes chagásicos con miocardiopatía crónica exhibían daño en los ganglios parasimpáticos intramurales cardíacos, así como una reducción neta en el número de neuronas intramurales subepicárdicas [162]. Modelos experimentales de infección por *T. cruzi* corroboraron estos hallazgos y demostraron parasitismo neuronal asociado a periganglionitis y lesiones degenerativas en células de Schwann y fibras nerviosas [163]. Como indicamos anteriormente, el correlato funcional de estas lesiones orgánicas son las alteraciones en la regulación autonómica de PA y la FC (disautonomía). Debido a que la disfunción autonómica sistémica puede ser detectada antes de las manifestaciones crónicas tales como disfunción ventricular, y en todas las fases de la enfermedad, incluyendo al período indeterminado y las formas digestivas, se ha sugerido la participación de mecanismos disautonómicos en el desarrollo de los trastornos crónicos cardíacos. Además, la despoblación de neuronas ganglionares intramurales, tanto a nivel cardíaco como gastrointestinal en algunos pacientes chagásicos, ha sido postulada por algunos autores como el principal mecanismo de cardiomegalia y enteromegalia en la enfermedad de Chagas. De hecho, la destrucción de ganglioneuronas intramurales en el esófago y el colon constituye el factor etiopatogénico clásico para la acalasia y el megacolon, ya sean de naturaleza idiopática o secundarios a otras enfermedades, incluyendo la enfermedad de Chagas [164-166]. En este sentido, la teoría neurogénica podría constituir un mecanismo fisiopatológico desencadenante de trastornos motores digestivos en la enfermedad de Chagas. En cuanto a las alteraciones cardíacas de la etapa crónica, es posible que la disautonomía pueda generar complicaciones funcionales a nivel cardíaco (muerte súbita, agravamiento de las alteraciones en la contractilidad miocárdica, dilatación de las cámaras, generación de vasoespasmo microcirculatorio), pero no existen evidencias de que desempeñen un rol etiopatogénico esencial en la miocardiopatía chagásica crónica [155].

d) *Teoría inmunológica*: la percepción del largo período que transcurre entre la primoinfección y la cardiopatía y/o los trastornos digestivos, la presencia de un infiltrado linfomononuclear en las lesiones, la ausencia aparente de parásitos y su falta de relación con los infiltrados inflamatorios sumados a la evidencia de una variada respuesta inmune humoral y celular contra estructuras musculares y nerviosas, y el depósito de inmunoglobulinas y complemento en el corazón chagásico, condujeron a postular la participación

mecanismos inmunopatológicos en la enfermedad de Chagas crónica [167]. Entre los mecanismos postulados para explicar la respuesta contra antígenos propios del huésped se encuentran el mimetismo molecular, la presentación de epitopes crípticos y/o la activación de células no específicas. Se demostró la presencia anticuerpos séricos reactivos contra músculo cardíaco y liso (esofágico o colónico) así como dirigidos contra los receptores muscarínicos y adrenérgicos. Por otra parte, también se documentó la presencia de antígenos comunes entre *T. cruzi* y fibras miocárdicas humanas así como células T reactivas contra antígenos del corazón y nervios, tanto en modelos animales como en pacientes chagásicos [155].

Debido a que ninguna de las teorías descritas puede explicar por si sola el desarrollo de todas las manifestaciones clínicas características de la enfermedad crónica, se ha concluido que la fisiopatología de la Tripanosomiasis cruzi es multifactorial, es decir que reúne elementos de las diferentes teorías. Actualmente se considera que las manifestaciones crónicas de la enfermedad de Chagas dependen de interacciones complejas entre el parásito y los tejidos del huésped.

1.6.9. Anticuerpos séricos contra receptores a neurotransmisores en la enfermedad de Chagas

1.6.9.1. Generalidades

La presencia conjunta de alteraciones anatómicas y funcionales en el SNA de los pacientes chagásicos y una variada respuesta inmune humoral contra antígenos cardíacos y nerviosos durante el curso de la enfermedad sugirió la participación de mecanismos inmunológicos mediados por anticuerpos en la regulación autonómica de los pacientes.

Por otra parte, se había documentado la presencia de anticuerpos circulantes en el suero de los pacientes chagásicos, en las fases crónicas con y sin patología demostrable, que eran capaces de interactuar con los receptores β_1 y β_2 adrenérgicos (Acs anti- β_1 AR y anti- β_2 AR) y muscarínicos colinérgicos M_2 (Acs anti-RM₂) [168, 169]. El hallazgo y subsecuente caracterización farmacológica de estos anticuerpos constituyó un aval significativo a la hipótesis vislumbrada en estudios previos sugiriendo que la disautonomía chagásica podría ser la consecuencia de un “bloqueo” de neurotransmisores en ambas ramas del SNA (simpática y parasimpática) [143].

1.6.10. Anticuerpos circulantes contra el receptor muscarínico M_2 en la enfermedad de Chagas

1.6.10.1. Introducción

A principios de los años `90. diversos trabajos demostraron que la fracción IgG circulante de pacientes chagásicos con disautonomía (IgG ChD), exhibía una actividad depresora de la contractilidad cardíaca, bloqueable con antagonistas muscarínicos [169]. A partir de este hallazgo, se emprendió la caracterización inmunológica y farmacológica de esta fracción de anticuerpos con actividad muscarínica.

A continuación, se describen las propiedades inmunofarmacológicas más relevantes de los Acs anti- RM_2 séricos detectados en los pacientes chagásicos crónicos. Para esto, se utilizó como fuente de anticuerpos a las fracciones IgG séricas con actividad muscarínica inotrópica negativa sobre el miocardio auricular de rata. La mayor parte de estas fracciones IgG fue purificada a partir de sueros de pacientes chagásicos con disautonomía.

1.6.10.2. Interacción con el RM_2

Inhibición de la unión específica de ligandos

Las fracciones IgG purificadas a partir de sueros de pacientes chagásicos (IgG Ch) inhiben la unión específica del antagonista muscarínico $^3[H]$ -QNB a los RM_2 en membranas de aurículas de rata, en forma no competitiva. En contraste, las fracciones IgG de individuos controles (IgG Control) no modifican la unión del radioligando. Este hallazgo sugirió una interacción entre los Ac anti- RM_2 y su receptor blanco, ya sea directa o a través de alguna molécula intermediaria [169, 170].

Western Blot e inmunoprecipitación

En ensayos de Western blot sobre membranas cardíacas solubilizadas de rata, los sueros de pacientes chagásicos reconocen una proteína de 80 kDa, similar al documentado en la literatura para el RM_2 , que no es detectada por los sueros de individuos controles (sueros controles) [170]. Para confirmar la identidad de esta proteína, se inmunoprecipitaron RM_2 humanos recombinantes en presencia de sueros de pacientes chagásicos o controles. El análisis de las proteínas precipitadas mediante Western Blot, utilizando un anticuerpo monoclonal anti- RM_2 , mostró una proteína de 55 kDa, cuyo

tamaño corresponde al del RM₂ no glicosilado, confirmando la interacción directa entre los Acs anti-RM₂ y su receptor blanco [171].

Especificidad de epítotope

Estudios previos habían documentado que la región inmunogénica dominante de los Acs anti-Rβ₁A y Acs anti-RM₂ de pacientes con miocardiopatía idiopática dilatada era una secuencia polianiónica en el II LEC de estos receptores [172, 173]. En particular, el II LEC del RM₂ contiene un cluster ácido cuya secuencia es: Glu₁₇₂-Asp₁₇₃-Gly₁₇₄-Glu₁₇₅-Cys₁₇₆, (EDGEC). La secuencia invertida CEGDE presenta alta homología con una secuencia polianiónica similar en la proteína ribosomal P0 del *T. cruzi* (AESDE). En base a estos antecedentes, se propuso que los anticuerpos del paciente chagásico generados contra la proteína ribosomal P0 tendrían la capacidad de interactuar con el II LEC del RM₂, a través de una reacción cruzada (mimetismo molecular) [174].

Para determinar si la región inmunogénica dominante de los Acs anti-RM₂ de pacientes chagásicos estaba localizada en el II LEC del receptor, se realizaron enzoinmunoensayos evaluando la inmunoreactividad de sueros de pacientes chagásicos o controles frente a un péptido sintético con la secuencia aminoacídica '169-192' del RM₂ humano (pM₂), que incluía el cluster ácido EDGE. Los sueros de pacientes chagásicos reaccionaron positivamente frente al antígeno inmovilizado, mientras los sueros controles resultaron negativos [174-176]. Estos resultados posibilitaron la purificación de la fracción monoespecífica IgG anti-pM₂ a partir de la fracción IgG Ch sérica total mediante cromatografía de afinidad contra el pM₂ acoplado a una matriz insoluble. La interacción entre el RM₂ cardíaco y la fracción IgG anti-pM₂ fue posteriormente detectada mediante Western Blot. Estos resultados no solamente permitieron demostrar un epítotope específico de los Acs anti-RM₂ en la molécula del receptor, sino contar con una fracción IgG monoespecífica para poder evaluar selectivamente la actividad funcional de los anticuerpos sobre RM₂ en los sucesivos experimentos [174-176].

1.6.10.3. Activación del RM₂

Los Acs anti-RM₂ activan a su receptor blanco de modo semejante a un agonista muscarínico, estimulando vías de señalización clásicamente asociadas a la activación de

este subtipo de receptor, así como efectos biológicos gatillados por estas señales [175, 177].

Señalización

Los Acs anti-RM₂ de pacientes chagásicos gatillan eventos bioquímicos clásicamente asociados a la activación de RM₂, a saber:

- a) En tiras de aurícula y músculo liso de esófago distal o colon distal de rata, promueven una disminución en los niveles de AMPc, tanto basales como estimulados por PGE₁ o isoproterenol [148, 149, 170, 175, 178, 179].
- b) En miocardiocitos de conejo, disminuyen la conductancia al Ca²⁺ mediada por canales tipo 'L' así como la probabilidad y el tiempo promedio de apertura de dicho canal [180].
- c) En el miocardio auricular de rata, estimulan el ciclo de fosfoinosítidos, la actividad de PKC, la actividad de óxido nítrico sintasa, y los niveles intracelulares de GMPc [177, 181].

Efectos fisiológicos

La modulación de las señales intracelulares mencionadas anteriormente por los Acs anti-RM₂ presentes en la fracción IgG Ch promueve: a) efecto inotrópico negativo sobre la aurícula de rata [169, 170, 175-178, 181]; b) efecto cronotrópico negativo en la aurícula aislada de rata adulta [179], en miocardiocitos de rata neonatal [174] o en corazón de conejo perfundido [182]; c) bloqueo A-V en corazón perfundido de conejo [182] e; d) incremento del tono basal en músculo liso de esófago distal [148] o colon distal [149] de rata.

El efecto inotrópico negativo de los Acs anti-RM₂ fue antagonizado por inhibidores de PKC, NOS, Ca²⁺/calmodulina y guanilato ciclasa, sugiriendo una vía novedosa en la activación de RM₂ por estos anticuerpos en el miocardio de rata, cuyo mecanismo no se ha dilucidado hasta el presente [177, 181].

Especificidad de los efectos bioquímicos y fisiológicos

Tanto los efectos fisiológicos como bioquímicos de los Acs anti-RM₂ resultaron similares a los obtenidos en presencia del agonista muscarínico carbacol, aunque los autoanticuerpos exhibieron menor eficacia [148, 170, 175, 177-179, 181, 182]. Estos efectos fueron inhibidos por un antagonista muscarínico no selectivo (atropina) [149, 169, 170, 175, 177-182] por un antagonista muscarínico selectivo para el subtipo 'M₂' (AF-DX 116) [148, 149, 177, 179, 181] y; por la preincubación de la fracción IgG Ch con el péptido

sintético pM₂ [148, 149, 175, 179]. En todos los casos en que se investigó la actividad muscarínica de la fracción IgG Ch anti-pM₂ (monoespecífica), ésta logró reproducir los efectos de la fracción IgG Ch completa [148, 149, 175, 179, 180]. Los efectos inotrópico y cronotrópico negativos sobre la aurícula aislada de rata, los efectos estimulatorios del tono contráctil de esófago y colon distales de rata y la inhibición de los niveles estimulados de AMPc promovidos por los Acs anti-RM₂ fueron inhibidos mediante preincubación de los tejidos correspondientes con PTX; sugiriendo que los efectos de los anticuerpos están mediados por proteínas G_{i/o} [148, 149, 178]. Los efectos bioquímicos y fisiológicos de la fracción IgG Ch sobre el miocardio auricular de rata fueron mimetizados por la fracción F(ab')₂ correspondiente, confirmando que dichos efectos están gatillados por el sitio de combinación de la molécula de IgG, descartando así la participación del fragmento Fc [178].

1.6.10.4. Mecanismos inmunofarmacológicos asociados a la activación del RM₂

Del agonismo parcial al alosterismo

En los primeros estudios sobre Acs anti-RM₂ en la enfermedad de Chagas se ha caracterizado a estos anticuerpos como “agonistas muscarínicos parciales” [169] en virtud de su capacidad para activar al RM₂ con menor eficacia que los agonistas farmacológicos totales. Los estudios subsiguientes buscaron profundizar el conocimiento acerca del rol farmacológico de los Acs anti-RM₂ para corroborar esta hipótesis. Dado que los agonistas parciales pueden inhibir (parcialmente) la actividad farmacológica de los agonistas totales, se investigó la capacidad de los Acs anti-RM₂ para inhibir los efectos del carbacol sobre la contractilidad del miocardio auricular de rata. Así se logró demostrar que la preincubación de las aurículas con concentraciones subumbrales de la fracción IgG Ch (o su fragmento derivado F(ab')₂) inhibe parcialmente los efectos inotrópicos negativos de carbacol [170] y pilocarpina [169, 178] en forma no competitiva (disminuyendo la eficacia del agonista, sin afectar su potencia). Este efecto fue mimetizado por la fracción monoespecífica IgG anti-pM₂ [175]. Desde el punto de vista del mecanismo de acción, estos estudios avalaban la hipótesis del agonismo parcial para los Acs anti-RM₂.

Posteriormente, Hernández y col. plantearon una explicación alternativa al “agonismo parcial”, sugiriendo que la interacción de los Acs anti-RM₂ con su receptor blanco es de naturaleza “alostérica” [183]. Esta hipótesis se basa en que la secuencia EDGE contenida en el II LEC del RM₂ -que constituye el epítopo de los Acs anti-RM₂- es

coincidentalmente con un sitio alostérico exhaustivamente caracterizado en el RM₂ [184]. Dado que, por definición, los agonistas parciales farmacológicos se unen al sitio ortostérico de un receptor mientras que los Acs anti-RM₂ se unen a un sitio alostérico de su receptor blanco, se postuló que estos anticuerpos actuarían como moduladores alostéricos de este subtipo de receptor. Ensayos funcionales realizados en miocardiocitos de conejo permitieron demostrar que los sueros de pacientes chagásicos, a diferencia de los sueros controles, potencian el efecto cronotrópico negativo inducido por ACh (exhibiendo un incremento en la pendiente de Hill), así como la incidencia de bradiarritmias. En ensayos de unión de ligandos (utilizando baja fuerza iónica, para favorecer las interacciones alostéricas) se demostró que los Acs anti-RM₂ incrementan la afinidad de la ACh por el RM₂, sugiriendo que los Ac anti-RM₂ actúan como moduladores alostéricos positivos (cooperatividad positiva entre agonistas muscarínicos y Acs anti-RM₂). Utilizando ensayos similares, se demostró que los Acs anti-RM₂ disminuyen la afinidad de los antagonistas muscarínicos por su receptor blanco, actuando como moduladores alostéricos negativos [183].

Rol del crosslinking de receptores

Debido que los Acs anti-RM₂ son moléculas de IgG bivalentes, se investigó el rol de la bivalencia en los efectos muscarínicos de estos anticuerpos. Se demostró que un anticuerpo monoclonal anti-*T. cruzi* (CAK20.12) era capaz de reconocer tanto el II LEC del RA-β₁ humano como el epítopo análogo en el RM₂, mediante ELISA. En el miocardio auricular murino, este anticuerpo fue capaz de: a) activar al RA-β₁, promoviendo un incremento en los niveles intracelulares de AMPc y un efecto inotrópico positivo, en presencia de atropina (bloqueante de los RM₂); b) activar al RM₂, estimulando la acumulación de GMPc y promoviendo un efecto inotrópico negativo, en presencia de propranolol (bloqueante de RA-β). Los efectos bioquímicos y fisiológicos del anticuerpo bivalente fueron mimetizados por su correspondiente fragmento Fab, sugiriendo que su actividad "agonista" β₁ adrenérgica y M₂ muscarínica no requiere de *crosslinking* de receptores [185].

1.6.10.5. Regulación de la expresión y la función del RM₂

En virtud de su capacidad para activar al RM₂ se investigó si los Acs anti-RM₂

circulantes de pacientes chagásicos podían también regular la función de su receptor blanco. En células CHO expresando en RM₂ se demostró que la fracción IgG Ch: a) mimetiza la acción de la ACh disminuyendo la afinidad del RM₂ por carbacol, a diferencia de la IgG Control, que no modifica la afinidad del RM₂ por el agonista. Estos datos sugieren que la IgG Ch es capaz de promover el desacople RM₂/proteínas G. Por otra parte, tanto la fracción IgG Ch como su fragmento F(ab')₂ lograron promover el secuestro de receptores de la superficie celular [171]. En conjunto, estos resultados sugieren que los Acs anti-RM₂ podrían desensibilizar a su receptor blanco mediante un mecanismo de regulación homóloga. El potencial correlato fisiopatológico de estos resultados se vincula a que la activación sostenida de los RM₂ por los anticuerpos específicos podría regular su función *in vivo*, atenuando la función del agonista endógeno. Sin embargo, otros autores no han logrado reproducir estos resultados [183].

1.6.10.6. Correlación entre la presencia de Acs anti-RM₂ y la patología

A partir del hallazgo de los Acs anti-RM₂ en los pacientes chagásicos crónicos, se intentó correlacionar la presencia de estos anticuerpos circulantes con las manifestaciones cardiovasculares y digestivas de estos pacientes, a saber:

a) *Disfunción del nódulo sinoauricular(DNS)*: Se ha reportado una alta prevalencia de Acs anti-RM₂ en pacientes con DNS (71%) [186, 187] y (78%) [188], habiéndose demostrado que la prevalencia de Acs anti-RM₂ en pacientes con DNS es independiente de la disfunción ventricular [187]. Es llamativo que las alteraciones electrofisiológicas de los pacientes chagásicos con DNS y Acs anti-RM₂ pueden ser total o parcialmente revertidas mediante el tratamiento de los pacientes con atropina [188]. En base a estas evidencias es posible que estos anticuerpos jueguen un papel importante en la fisiopatología de la DNS, aunque este mecanismo no ha sido dilucidado hasta el presente.

b) *Acalasia esofágica*: Se ha documentado una fuerte asociación entre acalasia esofágica y Acs anti-RM₂ en pacientes chagásicos crónicos, con una prevalencia de Acs anti-RM₂ del 84% [148]. La presencia de anticuerpos con actividad agonista muscarínica sobre el esófago distal de rata (Ver sección 1.1.6.3) introduce un factor humoral excitatorio que podría promover una relajación alterada del esfínter esofágico inferior, contribuyendo al desbalance excitatorio/inhibitorio de la actividad motora esofágica en la acalasia chagásica [189].

c) *Megacolon*: Se ha detectado una fuerte asociación entre megacolon y Acs anti-RM₂ en pacientes chagásicos crónicos, con una prevalencia de Acs anti-RM₂ del 87% [149]. Se ha propuesto que la exposición crónica de los RM₂ del musculo liso del colon a los Acs anti-RM₂ podrían atenuar los efectos excitatorios del agonista endógeno ACh sobre la contractilidad del músculo liso colónico, ya sea en virtud de su actividad agonista parcial (sección 1.6.10.4) y/o su capacidad para desensibilizar al RM₂ (sección 1.6.10.5) [189].

d) *Disautonomía cardiovascular*: En diversos grupos de pacientes chagásicos e individuos controles no infectados se evaluó la funcionalidad del SNA mediante una batería de pruebas funcionales clásicas y se monitoreó la presencia de anticuerpos anti-RM₂ mediante ensayos biológicos [169] o de ELISA [175, 179]. Se concluyó que: a) existe una alta prevalencia de Acs anti-RM₂ en pacientes chagásicos crónicos con disautonomía (ChD), que resultó significativamente mayor a la de pacientes chagásicos crónicos sin disfunción autonómica (ChND), tanto en pacientes asintomáticos [ChD vs ChND: (86% vs 37%) [169], (89% vs 26,5 %) [175], (91% vs 23%) [179]] como en cardiopatas [ChD vs. ChND: (85% vs 23%) [179]]. El hecho de que la asociación entre Acs anti-RM₂ y disautonomía se haya podido demostrar en pacientes chagásicos asintomáticos implica que no existe otra variable confusora (síntoma, signo, trastorno) que permitiera suponer su eventual asociación con la presencia de Acs anti-RM₂ circulantes. Por este motivo se puede considerar a los Acs anti-RM₂ como marcador independiente de disautonomía en los pacientes chagásicos crónicos [169, 175, 179].

Las respuestas de la FC a la maniobra de Valsalva son el resultado de mecanismos relacionados, predominantemente, con reflejo barorreceptor, que involucra a la rama parasimpática del SNA, con dudosa participación de la rama simpática [190]. Estudios de nuestro laboratorio indican que, de todas las pruebas utilizadas para valorar la funcionalidad del SNA, la maniobra de Valsalva presenta mayor sensibilidad (82 %) y especificidad (91%) que las demás pruebas [179]. Más aún, la detección de Acs anti-RM₂ adquiere su máxima sensibilidad (100%) y especificidad (92,5%) en pacientes chagásicos con anormalidades en esta prueba, en comparación con las demás [179]. Estas observaciones sugieren la existencia de una asociación particular entre Acs anti-RM₂ y disfunción parasimpática. Dado que los RM₂ constituyen los receptores efectores en la rama parasimpática a nivel cardíaco, es razonable sospechar que los Acs anti-RM₂ puedan tener un rol fisiopatogénico en la disfunción parasimpática. En esta línea de

razonamiento, Ribeiro y col. demostraron: a) niveles elevados de Acs anti-RM₂ circulantes e índices HF de la HRV reducidos en pacientes chagásicos crónicos con o sin disfunción del ventrículo izquierdo (DVI). Debido a que el índice HF es un marcador inequívoco de disfunción parasimpática, esto indica que la disfunción vagal aparece tempranamente en los pacientes chagásicos crónicos y es independiente de la DVI; b) Los niveles de Ac anti-RM₂ circulantes correlacionan significativa y negativamente con los índices HF en 75 pacientes chagásicos crónicos con/sin DVI. En consecuencia, estos hallazgos sugieren que los Acs anti-RM₂ podrían ejercer un efecto inhibitorio sobre la función vagal en pacientes chagásicos crónicos [160].

Más recientemente, otros autores estudiaron las respuestas cronotrópicas a la maniobra de Valsalva (MV) y al ejercicio dinámico (ED) en pacientes chagásicos crónicos con función del ventrículo izquierdo normal. En comparación con individuos controles no infectados, en los pacientes chagásicos se detectó: en la MV, un menor incremento absoluto de la FC en fase II y un mayor incremento absoluto de la FC en fase IV; en la prueba de ED, una recuperación temprana de la FC aumentada. Más aún, los niveles de Acs anti-RM₂ correlacionaron positivamente con los índices de recuperación de la FC en los pacientes chagásicos. Estos resultados, contrariamente a los obtenidos en los estudios previos [160, 169, 175, 179], sugieren que los Acs anti-RM₂ pueden presentar efectos muscarínicos positivos sobre el control de la FC en pacientes chagásicos crónicos [191].

2. HIPÓTESIS

2.1. Hipótesis de Trabajo

En base a los antecedentes descriptos anteriormente, destacamos los siguientes conceptos a los fines de definir nuestra hipótesis de trabajo.

- 1) Durante el curso de la enfermedad de Chagas algunos pacientes (aproximadamente el 30%) presentan disfunción autonómica cardiovascular (disautonomía) con una alteración en ambas ramas del SNA.
- 2) Por otro lado, en la enfermedad de Chagas se detectan anticuerpos circulantes capaces de unirse y activar al RM₂ (Ac anti-RM₂), con eficacia moderada respecto a los agonistas muscarínicos totales. Además, estos Acs estimulan rutas de señalización (vía proteína G) y gatillan efectos biológicos clásicamente asociados a la activación de RM₂.
- 3) Antecedentes previos de nuestro laboratorio indican que la preincubación de aurículas aisladas con la fracción IgG ChD [100, 169, 170, 177, 192] y su fracción monoespecífica anti-pM₂ [175] inhibe el efecto inotrópico negativo de carbacol o pilocarpina, en forma no competitiva.
- 4) En pacientes chagasicos crónicos con y sin cardiopatía: a) Existe una fuerte asociación entre la presencia de Acs anti-RM₂ circulantes y disautonomía [179]; b) Los niveles de Acs anti-RM₂ correlacionan con el grado de disfunción vagal (bloqueo de la rama parasimpática) [160]. Esto sugiere la participación de estos Acs en la fisiopatología de la disautonomía parasimpática en la Enfermedad de Chagas crónica.
- 5) El receptor efector en la rama parasimpática a nivel cardiaco es el RM₂. Debido a que diversos autores han postulado un rol causal de los Acs anti-RM₂ en la fisiopatología de la disautonomía chagásica, nos preguntamos si la exposición crónica de los RM₂ a los Acs anti-RM₂ podría afectar la respuesta de dicho receptor al agonista (y neurotransmisor) endógeno acetilcolina, promoviendo una inhibición en la actividad parasimpática. Hasta el presente no se ha dilucidado completamente el mecanismo a través del cual los anticuerpos en cuestión puedan alterar la actividad parasimpática en los pacientes chagásicos crónicos

En base a estos antecedentes postulamos la siguiente hipótesis:

Los Acs anti-RM₂ pueden generar cambios conformacionales en la estructura del receptor que, a su vez, pueden afectar (eventualmente) la activación por agonista. Dado que se ha descrito que el RM₂ forma tetrámeros constitutivos en la membrana de las células [100], sospechamos que los Acs de los pacientes chagásicos con disautonomía pueden generar cambios conformacionales en la molécula del receptor o en su estado oligomérico, mediante el *crosslinking* de receptores por el Ac bivalente.

Debido a que los Acs pueden inhibir, de forma no competitiva, el efecto cronotrópico negativo de agonistas muscarínicos (carbacol y pilocarpina) postulamos que, los Acs anti-RM₂ son capaces de modular la señalización dependiente e independiente de proteínas G estimulada por agonista, mediante un mecanismo particular mediado por *crosslinking* de receptores. Hipotetizamos que el Ac bivalente estabiliza un estado conformacional del receptor blanco que modifica el estado de activación inducido por el agonista y, por lo tanto, las vías de señalización activadas.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo General*

Dilucidar el mecanismo de acción de los anticuerpos de pacientes chagásicos contra receptores muscarínicos M_2 (Acs anti- RM_2) y determinar el rol de los mismos en la disautonomía cardiovascular que afecta a dichos pacientes.

3.2. *Objetivos Específicos*

3.2.1 Investigar la capacidad de los Acs anti- RM_2 presentes en el suero de pacientes chagásicos para modular la interacción entre receptores muscarínicos M_2 (RM_2).

3.2.2 Evaluar la especificidad del efecto modulador de la interacción RM_2/ RM_2 por los Acs anti- RM_2 a nivel de las moléculas del receptor y de la inmunoglobulina (IgG)

3.2.3 Evaluar la capacidad de los Acs anti- RM_2 para modular el reclutamiento de arrestinas al RM_2 activado por agonista

3.2.4 Evaluar la capacidad de los Acs anti- RM_2 para modular la señalización dependiente de proteína G_i , subsecuente a la activación del RM_2 por agonista

3.2.5 Determinar si los eventos investigados en 3.2.1, 3.2.3 y 3.2.4 están mediados por *crosslinking* de receptores

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Drogas

En el transcurso del presente trabajo se utilizaron, en particular, los siguientes reactivos de laboratorio: clorhidrato de carbamilcolina, clorhidrato de pilocarpina, sulfato de atropina, trietioduro de galamina, clorhidrato de tetraciclina, ampicilina sódica, sulfato de kanamicina y p-nitrofenil fosfato (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA); DEAE celulosa (DE-52, GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA); Affi-Gel 15 (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA); celenteracina h (Biotium); [³H]-N-metilescopolamina y [³H]-quinuclidinil benzilato (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA); papaína-agarosa (Pierce Biotechnology, Rockford, IL); proteína G-agarosa (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA); DMEM (Applichem GmbH Darmstadt, Alemania); Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA); anticuerpo (IgG) anti-IgG humana conjugado a fosfatasa alcalina -específico para el fragmento Fcy de la IgG humana, obtenido en cabra- y anticuerpo (IgG) anti-Fab humano, obtenido en cabra (Jackson Inmuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA)

4.2. Caracterización clínica y serológica de los pacientes

4.2.1. Reclutamiento de los pacientes

En el presente trabajo se estudiaron pacientes (n=45) de ambos sexos, entre 42 y 65 años, los cuales fueron reclutados en el Consultorio Integral de Chagas del hospital DF Santojanni (Pilar 950 CABA) por referencia del banco de sangre y los consultorios externos del hospital, o bien de los centros de atención primaria de la salud periféricos. La población de estudio incluyó pacientes chagásicos crónicos (n=30) y voluntarios controles no chagásicos (n=15), los cuales fueron estudiados durante el período 2009-2013. Todos los pacientes eran residentes estables en el Área Metropolitana de Buenos Aires al momento del estudio, y reunían antecedentes de residencia previa en zona endémica para Chagas.

4.2.2. Evaluación clínica de los pacientes

Inicialmente, todos los pacientes fueron evaluados mediante historia clínica, examen físico, Rx de tórax, ECG convencional de 12 derivaciones, *holter* de 24 horas, ecocardiografía bidimensional y examen inmunoserológico para enfermedad de Chagas. Éste diagnóstico

se realizó en base a 3 reacciones estándar (hemoaglutinación pasiva, inmunofluorescencia indirecta y enzimoimmunoensayo), considerándose reactivo para Chagas a todo suero que presentara al menos dos reacciones positivas. Aquellos pacientes con hipertensión arterial, diabetes melitus, disfunción tiroidea, enfermedades sistémicas crónicas, otras enfermedades infecciosas o tratamiento previo con benznidazol fueron excluidos del presente estudio.

4.2.3. Evaluación del Sistema Nervioso Autónomo de los pacientes

La funcionalidad del SNA fue evaluada en los 45 pacientes seleccionados mediante 4 pruebas clásicas: maniobra de Valsalva, prueba ortostática (Tilt Test), reflejo de la tos y prueba de hiperventilación, de acuerdo a los procedimientos estándar [143]. El diagnóstico de disautonomía fue determinado en base a la evidencia de al menos 2 pruebas funcionales anormales, en comparación con los pacientes no chagásicos controles (Grupo 3, según 4.2.4). En cada prueba se efectuaron registros de presión arterial sistólica y diastólica (mediante un tensiómetro convencional) y de frecuencia cardíaca (a partir del segmento R-R del ECG que se practica al paciente en el momento del estudio). Los detalles técnicos sobre estas pruebas y los criterios de positividad están documentados en trabajos previos [179]. Las actividades 4.2.1, 4.2.2 y 4.2.3 estuvieron a cargo del Dr. Sergio Auger y el Dr. Ahmed Sabra, responsables del Consultorio Integral de Chagas del Hospital DF Santojanni.

4.2.4. Conformación de los grupos de estudio

Una vez completados los estudios clínicos generales y los exámenes cardiovasculares, los pacientes fueron categorizados en 3 grupos, a saber: Grupo 1: Pacientes chagásicos con disautonomía cardiovascular (ChD) (n=15); Grupo 2: Pacientes chagásicos sin disautonomía cardiovascular (ChND) (n=15); Individuos controles (no chagásicos, sin disautonomía cardiovascular) (Control) (n=15). Los pacientes chagásicos (Grupos 1 y 2) presentaban alteraciones típicas del ritmo y la conducción cardíacos, tales como bloqueo completo de rama derecha y/o hemibloqueo anterior izquierdo, extrasístoles ventriculares, anomalías primarias en la repolarización, zonas eléctricas inactivas, complejos QRS de bajo voltaje, bradicardia sinusal (<50 lpm), bloqueo aurículo-ventricular avanzado o marca-paso. Sin embargo, estos pacientes presentaban dimensiones normales del ventrículo iz-

quierdo (VI), fracción de eyección del VI normal y función del VI (global y regional) normal, según la evaluación ecocardiográfica.

Este estudio fue diseñado y ejecutado en conformidad con los principios de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital DF Santojanni. Todos los pacientes involucrados en el estudio firmaron un consentimiento informado aceptando su participación en mismo.

4.3. Actividades relacionadas con los anticuerpos a evaluar

4.3.1. Obtención y conservación de sueros

Se extrajo una muestra de 20 ml de sangre a cada paciente estudiado al cabo de 8 h de ayuno. Para cada muestra se dejó exudar el suero a 37°C durante 60 min. Los sueros se separaron del coágulo por centrifugación (15 min a 1500 xg) y, luego de fraccionados, se conservaron a -80°C.

4.3.2. Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA)

La presencia de Acs anti-RM₂ en los sueros estudiados fue detectada mediante enzoinmunoensayo (ELISA), empleando como antígeno inmovilizado un péptido sintético cuya secuencia aminoacídica corresponde al II-LEC del RM₂ (pM₂: residuos 168-192: VRTVEDGECYIQFFSNAAVTFGTAI) (Genemed Synthesis, South San Francisco, CA, USA) [173]. Placas de ELISA de 96 pocillos fueron incubadas durante toda la noche (ON) a 4°C con una solución de pM₂ en Na₂CO₃ 0,1 M. pH 11 (2,5 µg/50 µl/pocillo). A continuación, los pocillos fueron tratados durante 2 h a 37°C con suero fetal bovino (SFB) 10% en buffer fosfato salino (PBS) (NaHPO₄/KH₂PO₄ 10 mM, ClK 2,7 mM y ClNa 137 mM pH 7,4) con el objeto de bloquear los sitios de unión inespecíficos. Luego, el péptido inmovilizado fue incubado durante 2 h con una dilución de suero de paciente chagásico o control (1:50), por duplicado. La presencia de los complejos inmunes pM₂/anticuerpo fue detectada mediante la incubación con anti-IgG (γ) humana-Fosfatasa alcalina (1/6000) durante 1 h, y posterior adición del sustrato p-nitrofenil fosfato (1mg/ml) a temperatura ambiente (TA). Luego de 30 minutos de incubación de la placa en oscuridad, los valores de densidad óptica (DO) fueron registrados a 405 nm en un espectrofotómetro de ELISA µQuant (BioTek, Winooski, VT, USA). Salvo indicación contraria, todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda a 37°C. Los lavados previos a cada incubación fueron realizados

con PBS/Tween 20 (PBS pH 7,4, Tween 20 0,05%). En cada experimento, se estableció como valor de corte (VC) la DO_{405nm} media + 2 desvíos estándar (DS) de 15 individuos controles (Grupo 3). Se consideró que un suero presentaba reactividad positiva anti-pM₂, cuando su DO a 405 nm era mayor que el VC (Figura 19A) [148, 175]. Por otro lado, se calculó el “índice de reactividad” (IR) de cada muestra analizada como el cociente entre la DO_{405nm} promedio de cada muestra sérica y VC, en el mismo experimento. Las muestras séricas con un $IR \geq 1,1$ fueron considerados positivas para Acs anti-RM₂.

La reactividad de las fracciones IgG anti-pM₂ e IgG no anti-pM₂ purificadas por afinidad (sección 4.3.4) se analizó mediante ensayos de saturación e inhibición. Para ello, las placas de ELISA de 96 pocillos sensibilizadas con pM₂ y bloqueadas con SFB fueron tratadas según dos protocolos alternativos: *a) Ensayos de saturación:* Los pocillos fueron tratados durante 2 h con IgG anti-pM₂ o IgG no anti-pM₂, en concentraciones variables, previamente incubadas durante 1 h en presencia o ausencia de pM₂ soluble (100 μ M). *b) Ensayos de inhibición:* Los pocillos fueron tratados con IgG anti-pM₂ o IgG no anti-pM₂ (0,5 μ M) previamente incubadas en ausencia de pM₂ o con pM₂ soluble en concentraciones variables. La presencia de los complejos inmunes fue detectada según se describió anteriormente.

La reactividad anti-pM₂ de las fracciones Fab de pacientes chagásicos y controles, obtenidas por digestión papaínica (sección 4.3.5), también fueron monitoreadas mediante un ensayo de inmunoensayo competitivo, en los cuales se evaluaron sus capacidades para interferir con la reactividad de los sueros correspondientes frente al pM₂ inmovilizado. En este caso, las placas previamente sensibilizadas con pM₂ fueron bloqueadas con PBS/SFB y luego tratadas durante 2 h con PBS/seroalbúmina bovina albúmina 1% (PBS/BSA 1%) o con los fragmentos Fab de pacientes chagásicos o controles (2,7 μ M) diluidos en el mismo buffer. Posteriormente, los pocillos fueron tratados durante otras 2 h con PBS.A 1% o el suero entero de los pacientes chagásicos o controles a partir de los cuales se habían obtenidos los fragmentos Fab correspondientes (dilución 1/50). La presencia de los complejos inmunes fue detectada según se describió anteriormente.

4.3.3. Purificación de la fracción IgG sérica

La fracción IgG sérica de pacientes chagásicos o individuos controles fue aislada mediante cromatografía de intercambio iónico en DEAE celulosa [171, 179]. Cada suero (12 ml) fue dializado contra buffer de siembra (BS) (Na_2HPO_4/KH_2PO_4 7 mM, pH 8) y

luego eluído con buffer de elución ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 10 mM, pH 8) a través de una columna de DEAE celulosa previamente equilibrada con BS. El pico del eluato fue concentrado por ultrafiltración (valor de corte: $\text{PM} = 10$ kDa) (Amicon, Millipore, Bedford, MA, USA) hasta obtener una concentración $\sim 20\text{-}30$ mg/ml. Las muestras fueron fraccionadas y conservadas a -80°C . La pureza de la fracciones IgG séricas obtenidas fue evaluada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, según se describe en la sección 4.10.

4.3.4. *Aislamiento de la fracción IgG monoespecífica anti-pM₂*

Las fracciones IgG de los sueros de pacientes chagásicos con disautonomía que habían revelado alta reactividad ($\text{IR} > 1,1$) contra el II-LEC del RM₂ mediante ELISA fueron sometidas a cromatografía de afinidad a través de una columna de Affi-Gel 15 acoplada covalentemente al péptido pM₂, cuya secuencia aminoacídica fue indicada en ella sección 4.3.2. El acoplamiento de pM₂ a la resina se realizó según las especificaciones del fabricante y fue descrito en trabajos previos [175]. La fracción IgG ChD fue incubada con la resina (Affi-Gel 15-pM₂) equilibrada con PBS durante 1 h a TA y luego a 4°C durante 12 h en agitador rotatorio. Luego de la incubación, la suspensión se colocó en una columna de polipropileno (Poly-Prep, BioRad, Hercules CA, USA), eluyendo en primer lugar la fracción IgG no anti-pM₂ con PBS. Posteriormente, la fracción IgG monoespecífica anti-pM₂ fue eluída con KSCN 3M, NaCl 1M, y dializada inmediatamente contra PBS a 4°C . Los eluatos se concentraron por ultrafiltración (ver sección 4.3.3) y se conservaron a -80°C . La reactividad contra el péptido pM₂ de cada fracción monoespecífica purificada se confirmó mediante ensayos de ELISA, como fue indicado en la sección 4.3.2.

4.3.5. *Aislamiento del fragmento Fab*

Inicialmente se activaron 0,5 ml de suspensión de papaína-agarosa comercial mediante su resuspensión en buffer digestión (BD) (Na_2HPO_4 20 mM, EDTA 10 mM, cisteína 20 mM, pH 7.0). Luego, 10 mg de la fracción IgG purificada fueron disueltos en 1 ml de BD y la solución resultante fue mezclada con la suspensión de papaína-agarosa activada. La mezcla de reacción fue incubada durante 6-8 h en una estufa a 37°C con agitación rotatoria. Posteriormente, la suspensión resultante fue centrifugada y el sobrenadante conteniendo los productos de la digestión fue sometido a cromatografía de afinidad contra proteína G-agarosa con el fin de separar los fragmentos Fab del resto de los productos de reacción. Para ello, se tomaron 2 ml de suspensión de proteína G-agarosa comercial, se

equilibraron con PBS 1X pH 7,0 y se agregaron a una columna de poliprolileno (ver 3.3.4). Una vez sembrada la mezcla de digestión, se efectuaron 2 eluciones: la primera con PBS 1X (12 ml) seguida de otra con PBS 10X pH 7,0 (20 ml). La mezcla de ambos eluatos contenía los fragmentos Fab (Fracción I). Por otra parte, la fracción compuesta por los fragmentos Fc, IgG no digerida e IgG parcialmente digerida (Fab/c) (Fracción II) fue aislada a continuación, mediante elución con glicina 0,1M, pH 2,7. Ambas fracciones (I y II) fueron concentradas por separado, luego sometidas a un cambio de buffer (PBS) mediante ultrafiltración (valor de corte: PM= 10 kDa) y almacenadas a -80°C. La concentración final de los fragmentos Fab (~50 mg/ml) se determinó mediante el ensayo de Lowry [193]. La pureza de las fracciones Fab obtenidas fue monitoreada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, según el procedimiento detallado en la sección 3.10. La reactividad contra pM₂ de las fracciones monovalentes Fab obtenidas se confirmó mediante ELISA, como fue explicado en la sección 4.3.2.

4.4. Actividades relacionadas con los sistemas de expresión de receptores

4.4.1. Preparación de ADN plasmídico.

4.4.1.1. Preparación de bacterias competentes

El protocolo de preparación de bacterias altamente competentes utilizado en este proyecto es una versión modificada del procedimiento de Inoue et al [194]. Brevemente, se sembró una alícuota de suspensión de bacterias XL1-blue (resistentes a tetraciclina) en una placa de LB/agar suplementada con tetraciclina (NaCl 10 g/l, Triptona 10 g/l, Extracto de Levaduras 5 g/l, pH 7, Agar 1,5%, clorhidrato de tetraciclina 20 µg/ml) (LB/Agar/Tet). La placa se incubó ON en estufa a 37°C. A continuación, se inoculó una colonia en 5 ml de medio SOB/Tet (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, pH 7, tetraciclina 20 µg/ml) y se incubó en estufa a 37°C con agitación orbital vigorosa (250-300 rpm) durante 6 a 8 h. Luego, se transfirieron 2 ml de suspensión bacteriana del tubo a un erlenmeyer de 125 ml conteniendo medio SOB/Tet y éste se incubó ON a 18°C con agitación orbital moderada (200 rpm) en un agitador termostatzado Innova 4000 (New Brunswick, Edison, NJ, USA). Durante esta incubación, se monitoreó periódicamente la DO a 600 nm (DO₆₀₀) del cultivo bacteriano y la incubación fue finalizada al alcanzarse una DO₆₀₀= 0.5-0.7, que corresponde a la fase de

crecimiento exponencial. Posteriormente, se incubó el cultivo bacteriano en baño de agua helada durante 10 min y luego centrifugado a 6000 x g durante 10 min. El pellet obtenido fue resuspendido en 40 ml de buffer de transformación (BT) (HEPES 10 mM, CaCl₂.2H₂O 15 mM, KCl 250 mM, MnCl₂.4H₂O 55 mM, pH 6,7) y centrifugado a 6000 x g durante 10 min. Por último, el pellet resultante fue resuspendido en 10 ml de TB suplementado con DMSO 7,5%, fraccionado en tubos eppendorf y congelado instantáneamente. Las bacterias fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de su utilización [194].

4.4.1.2. Transformación de bacterias competentes

Se colocaron 10 µl de solución de ADN plasmídico (1-10 ng) en buffer Tris-CIH 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8 (TE) a 100 µl de suspensión de bacterias XL1blue competentes. Se dejó reposar la solución resultante en una mezcla de agua y hielo durante 10 min. Luego, las bacterias fueron sometidas a un shock térmico incubándose a 42°C durante 45-60 s e, inmediatamente después en agua/hielo durante de 5 min, para promover la incorporación del ADN plasmídico. La suspensión de bacterias transformadas fue incorporada a un tubo Falcon de polipropileno de y capacidad 14 ml con fondo en "U" (Becton Dickinson, Franidin Lakes, NJ, USA) conteniendo 900 µl de medio LB en ausencia de antibióticos y e incubada en estufa a 37°C durante 40 a 60 min con agitación orbital vigorosa.

4.4.1.3. Purificación del ADN plasmídico.

Las bacterias XL-Blue transformadas con los distintos plásmidos fueron seleccionadas en placas de Petri con medio LB/agar en presencia del antibiótico (ATB) correspondiente (ampicilina sódica 100 µg/ml o sulfato de kanamicina 30 µg/ml). Cada colonia seleccionada fue inicialmente inoculada en 5 ml de medio de selección LB suplementado con ATB (LB/ATB) -en igual concentración que la utilizada en la selección- y cultivada en estufa a 37°C durante 8 h. Luego, la suspensión bacteriana resultante fue amplificada transfiriéndose a erlenmeyers de 500 ml de capacidad conteniendo 250 ml de medio de selección LB/ATB y cultivándose durante 12-16 h a 37°C con agitación vigorosa hasta alcanzar una densidad de aproximadamente 3-4 x 10⁹ células/ml. Posteriormente, las bacterias fueron centrifugadas a 6000 xg durante 20 min y el ADN plasmídico se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico utilizando un kit comercial "ad hoc" (Plasmid Maxi-Kit) (QIAGEN, Gaithersburg, MD, USA). El ADN plasmídico sedimentado obtenido fue

disuelto en buffer TE y conservados a -20°C. Su concentración fue determinada mediante espectrofotometría UV (absorbancia a 260 nm).

4.4.1.4. Construcciones plasmídicas

Los plásmidos que codifican para las proteínas de fusión RM₂-RLuc, RM₂-YFP, RM₃-RLuc y RM₃-YFP se han generado combinando los fragmentos de ADNc que codifican para la luciferasa de *Renilla* (RLuc) o la proteína fluorescente amarilla (YFP) con los que codifican para los receptores muscarínicos M₂ o M₃ humanos, en el extremo carboxi-terminal de los mismos. Estas construcciones, así como el FLAG-M₂mAChR, fueron generosamente provistos por el Dr. Neil M. Nathanson (University of Washington, Seattle, WA, USA). Detalles acerca de su construcción y caracterización farmacológica se describen en nuestra publicación previa [100]. Arrestina-2-YFP fue un obsequio del Dr. Michel Bouvier (University of Montreal, Montreal, Canada) y su capacidad para interactuar con GPCR en presencia de agonistas fue caracterizada anteriormente [195]. pcDNA3.1/zeo (+) Apoaequorin, pCEFL-HA-Gaiq5 y pCEFL-GRK2 fueron generosamente provistos por la Dra. Beatie Niessler (University of Heidelberg, Heidelberg, Alemania), el Dr. J. Silvio Gutkind (Oral and Pharyngeal Cancer Branch, NIDCR/NIH, Bethesda, MD, USA) y la Dra. Carina Shayo (IByME-CONICET, Buenos Aires), respectivamente.

4.4.2. Cultivo de células de mamífero y transfección transitoria

Se cultivaron células de mamífero HEK 293T en medio DMEM suplementado con NaHCO₃ (2,2 gr/l), SFB (10%), penicilina (100 unidades/ml) y estreptomina (0.1 mg/ml) a 37°C en una incubadora con ambiente húmedo y CO₂ (5%). En los experimentos de BRET, las transfecciones transitorias con las distintas construcciones de ADN plasmídico se llevaron a cabo mediante el método de precipitación con fosfato de calcio [100]. En los ensayos de acuorina, las transfecciones transitorias se realizaron mediante lipofección utilizando Lipofectamina 2000, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En todos los procedimientos de transfección se utilizó el vector CS2+ como plásmido *carrier*.

4.5. Monitoreo de las interacciones receptor/receptor en células vivas

4.5.1. Preparación del sistema celular BRET

El sistema BRET utilizado en el presente trabajo para estudiar el efecto modulador de los anticuerpos anti-RM₂ sobre la interacción RM₂/RM₂ estaba compuesto por dos proteínas de fusión, RM₂-RLuc y RM₂-YFP, expresadas transitoriamente en células HEK 293T. En el procedimiento general, las células que presentaban una confluencia del 70-80% fueron transfectadas con RM₂-RLuc sola o cotransfectadas con RM₂-RLuc/RM₂-YFP en una relación molar de ADN plasmídico entre las proteínas de fusión [R-RLuc:R-YFP] de 1:2 o 1:3, dado que esta proporción aseguraba una expresión equimolar de ambas proteínas, de acuerdo a trabajos previos [100]. Al cabo de 36 h de incubación, las células fueron lavadas dos veces con PBS tibio a TA, luego resuspendidas en buffer Krebs-Hepes-Ringer (NaCl 130 mM, KCl 5 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 1,2 mM, Na₂HPO₄ 1,2 mM, glucosa 10 mM, HEPES 20 mM, pH 7,4), suplementado con BSA 0,1% (KHRA) y mantenidas sobre hielo hasta el momento de su uso.

4.5.2. Tratamiento de las células con ligandos muscarínicos y/o anticuerpos

Con el sistema celular BRET descrito en la sección 5.5.1 se estudiaron los efectos de los Acs anti-RM₂ presentes en la fracción IgG ChD en comparación con la fracción IgG control y diversos ligandos muscarínicos. A continuación, se detallan las condiciones particulares de los distintos ensayos realizados, antes de la detección de la señal BRET.

a) *Efectos de la fracción IgG ChD o la fracción IgG anti-RM₂ monoespecífica o los fragmentos monovalentes Fab sobre la interacción RM₂/RM₂*: Células expresando el par BRET RM₂-RLuc y RM₂-YFP fueron tratadas a TA durante distintos tiempos (0- 60 min) con las fracciones IgG séricas de pacientes chagásicos con disautonomía (IgG ChD) o IgG de individuos controles (IgG Control) (50 µM) o bien fueron incubadas con las mismas fracciones, en diferentes concentraciones (10, 25 o 50 µM), durante 60 min a TA. Alternativamente, las células fueron tratadas con las fracciones monoespecíficas anti-pM₂ de las IgG ChD (0,1-4 µM) suplementadas o no con IgG Control o IgG no anti-pM₂ (50 µM) o con los fragmentos Fab ChD o Fab Control (25 µM) en presencia o ausencia de una IgG anti-Fab humano preparada en cabra o IgG de cabra durante 60 min a TA.

b) *Especificidad de la molécula de receptor en el efecto de IgG ChD sobre la interacción receptor/receptor*: Células HEK 293T fueron transfectadas de manera transitoria con RM₂-RLuc o

RM₃-RLuc sola o cotransfectadas con los pares BRET RM₂-RLuc/RM₂-YFP, RM₃-RLuc/RM₃-YFP, RM₃-RLuc/RM₂-YFP o RM₂-RLuc/RM₃-YFP en una relación molar de ADN plasmídico entre las proteínas de fusión [R-RLuc: R-YFP] de 1:2 o 1:3, asegurando la expresión equimolar de ambas proteínas componentes del par BRET. Luego de 36 h, las células fueron tratadas a TA durante 60 min con IgG ChD o IgG Control 50 µM.

c) *Efecto de ligandos muscarínicos sobre la interacción RM₂/RM₂ en presencia o ausencia de Acs anti-RM₂*: Células coexpresando el par BRET RM₂-RLuc/RM₂-YFP fueron tratadas con carbacol, pilocarpina, atropina (1 o 10 µM), galamina (10 o 100 µM) o buffer KRH-BSA 0,1% durante 60 min a TA. Alternativamente, las células fueron preincubadas en presencia o ausencia de atropina y/o carbacol 10 µM durante 30 minutos y luego tratadas con IgG ChD o Control 50 µM durante 60 min a TA.

4.5.3. Cuantificación de la señal de BRET

En los últimos 15 min de incubación de cada ensayo se agregó el sustrato celenteracina h (5 µM final) y se efectuaron las mediciones de BRET, registrando la integración secuencial de la señal de luminiscencia en los rangos 440-500 nm y 510-590 nm mediante un luminómetro TD 20/20 (Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA). Los datos obtenidos fueron expresados como '*relación BRET*', definida como [(emisión a 510-590 nm)/(emisión a 440-500nm)] cotransfectado - Fc, donde Fc corresponde a (emisión a 510-590 nm)/(emisión a 440-500nm) para el RM₂-RLuc o RM₃-RLuc expresados individualmente [100].

Debido a que la señal BRET es alterada en presencia de inmunoglobulina IgG (o sus fragmentos Fab) de diferentes especies, los valores de relación BRET obtenidos en presencia de la IgG humana o sus Fabs fueron normalizados en función de aquellos obtenidos en presencia de una IgG patrón (IgG de cabra) o sus fragmentos Fab, a las mismas concentraciones. Se eligió como IgG de referencia la IgG de cabra debido a que su comportamiento resultó similar al de la IgG humana de individuos controles. En la muestra de referencia, tanto la fracción IgG de cabra como su fracción Fab correspondiente fueron disueltas en buffer KRHA. En conclusión, los cambios netos en la señal de BRET obtenidos luego del tratamiento con ligandos muscarínicos, IgGs humanas o sus fragmentos Fab, se expresaron como ΔBRET, en unidades de miliBrets [mB], siendo ΔBRET [mB] = (Relación BRET luego del tratamiento con ligandos/Acs/Fab - Relación BRET luego del tratamiento con buffer solo, IgG o Fab de cabra, respectivamente) x 1000.

4.6. Monitoreo de las interacciones receptor/receptor membranas crudas

4.6.1. Preparación de membranas celulares

Las membranas celulares se prepararon a partir de células HEK 293T expresando RM₂-RLuc sola o cantidades equimolares de RM₂-RLuc y RM₂-YFP cultivadas en placas de 10 cm. Al cabo de 36 h de incubación a 37°C las placas fueron lavadas con PBS 1X a TA y las células fueron cosechadas en 10 ml de PBS-glucosa 10% pH 7,4. Las suspensiones celulares fueron centrifugadas a 1000 xg durante 5 min y los pellets resultantes fueron resuspendidos en 2 ml de buffer fosfatos suplementado con inhibidores de proteasas (IP) (Na/KPO₄ 50 mM pH 7,4, aprotinina 1 µg/ml, leupeptina 2,5 µg/ml, pepstatina A 1,37 µg/ml, inhibidor de la tripsina de soja (STI) 1 µg/ml, EDTA 1 mM). Las suspensiones resultantes fueron homogenizadas manualmente 20 veces en un sistema vidrio-vidrio. Los lisados obtenidos fueron transferidos a tubos de centrifuga Nalgene (15 ml) (Nalge Nunc, Rochester, NY, USA). Los tubos se centrifugaron a 12.000 xg durante 15-20 min en una centrífuga refrigerada. Una vez descartados los sobrenadantes, se resuspendieron los pellets conteniendo las membranas crudas en 2 ml de PBS/IP y los homogenatos se conservaron a -80°C. Estas membranas se utilizaron en 2 procedimientos, a saber:

a) *Efectos de la fracción IgG ChD sobre la interacción RM₂/RM₂ en función de la concentración:* Membranas diluidas 1/10 en buffer KHRA fueron tratadas a TA durante 60 min con diferentes concentraciones de IgG ChD o IgG Control (10-50 µM).

b) *Efectos de antagonistas ortostéricos y moduladores alostéricos sobre la modulación de la interacción RM₂/RM₂ por IgG ChD:* Las membranas crudas expresando el par BRET RM₂-RLuc/RM₂-YFP fueron resuspendidas en un buffer de baja fuerza iónica (buffer Na/KPO₄ 5 mM, BSA 0,1%, pH 7,4). Una alícuota de 10 µl de membranas fue incubada con IgG ChD o Control 50 µM en presencia o ausencia de galamina 100 µM o atropina 10 µM durante una hora a TA.

En ambos procedimientos, una vez concluidos los tratamientos, se llevaron a cabo las mediciones de la señal de BRET como se indicó anteriormente (Sección 4.5.3).

4.7. Monitoreo de la señalización dependiente de proteína G. Ensayo de acuorina

4.7.1. Preparación del sistema celular

Células HEK 293T crecidas en placas de 6 pocillos fueron transfectadas de manera transitoria en una relación de ADN plasmídico FLAG-RM₂:G α_{q15} :ApoAcuorina [1:1:4] (6 μ g de ADN total) mediante el método de lipofección, utilizando Lipofectamine 2000 de acuerdo con las instrucciones del fabricante [126]. Transcurridas las 48 h, las células fueron lavadas dos veces con PBS tibio. Luego, las mismas fueron resuspendidas en 1,5 ml de PBS y centrifugadas a 450 xg durante 5 minutos. La incorporación del cofactor celenteracina h a las células fue realizado resuspendiendo las mismas en 200 μ l de medio DMEM suplementado con BSA 0.1%, HEPES 5 mM (pH 7,0) y celenteracina h 5 μ M, e incubándolas en oscuridad a 22°C durante 2,5 h. Finalmente, las células fueron centrifugadas a 450 xg durante 5 minutos y resuspendidas en un buffer *ad hoc* (BR) (NaCl 150 mM, CaCl₂ 1,8 mM, KCl 5,4mM, HEPES 10 mM, glucosa 20 mM, pH 7,4) con una densidad de 3 x 10⁶ células/ml. Las células fueron mantenidas en hielo y, antes de utilizarse, atemperadas a 25°C durante 15 min.

4.7.2. Monitoreo de [Ca²⁺]_i mediante luminometría

La suspensión de células HEK 293T expresando FLAG-RM₂, G α_{q15} y acuorina, fue dispensada en una placa blanca opaca con fondo en "U" de 96 pocillos (Wallac, Perkin Elmer, Boston, MA, USA) (100.000 células/pocillo) y atemperada a 25°C dentro del lector de placas durante 15 minutos. Debido a que los incrementos en la señal de luminiscencia inducidos por agonista ocurren en cuestión de segundos, se utilizó un lector de placas con inyector integrado (FluoStar Omega, BMG Labtech, Offenburg, Alemania) para registrar la emisión de luz antes, durante y después de la autoinyección del agonista (o BR).

Previamente a la inyección automatizada de BR solo o agonista se registró el valor basal de luminiscencia durante 8 s, en cada pocillo. Inmediatamente después de la inyección, y completada una breve agitación, se registró la señal luminiscente correspondiente al efecto del agonista/BR en intervalos de 0,5 s durante otros 45-60 segundos. Al final de cada experimento, las células fueron lisadas mediante autoinyección de 100 μ l de solución de lisis (Triton X-100 0,2% V/V, CaCl₂ 100 mM) y se registró la luminiscencia de la acuorina remanente durante otros 15 segundos. Esto permitió determinar la máxima

respuesta posible del sistema, la cual es dependiente de la cantidad total de acuorina celular en cada pocillo [126].

4.7.3. *Tratamiento de las células con ligandos muscarínicos y/o anticuerpos*

a) *Efecto del carbacol sobre la señalización dependiente de proteína G_i en función de la concentración de agonista:* Se sembraron 80 μ l de suspensión celular por pocillo (100.000 células) en placa de 96 pocillos y se autoinyectaron 20 μ l de solución de carbacol a 25°C, de modo de obtener concentraciones finales de agonista entre 1×10^{-8} y 1×10^{-3} M.

b) *Especificidad del efecto del carbacol sobre la señalización dependiente de proteína G. Curvas de inhibición en presencia de antagonista:* La suspensión celular fue preincubada en placa de 96 pocillos con antagonista (Concentración final: 1×10^{-8} M a 1×10^{-3} M) durante 15 minutos a 25°C y luego se autoinyectó la solución de carbacol a 25°C.

c) *Monitoreo de la especificidad de la proteína G del sistema bioluminiscente:* La suspensión de células HEK 293T expresando FLAG-RM₂ y ApoAeq, en presencia o ausencia de $G_{\alpha_{q15}}$ o G_{α_q} , fue tratada con BR o agonista, en diferentes concentraciones, a 25°C.

d) *Efecto del carbacol sobre la señalización dependiente de proteína G en presencia o ausencia de Acs anti-RM₂ o sus fragmentos monovalentes Fab:* La suspensión celular fue preincubada en presencia de la fracción IgG, o sus fragmentos monovalentes Fab, de pacientes ChD o individuos controles (0,1-10 μ M) durante 30 minutos a 25°C. Finalizada la incubación, las células fueron inmediatamente tratadas con carbacol (10 μ M).

Nota: Previo a la autoinyección del agonista/BR, se registró de la luminiscencia basal del sistema. Seguidamente, se registró la luminiscencia emitida posteriormente a la autoinyección de agonista (10 μ M) y luminiscencia emitida luego de la autoinyección de buffer lisis, según se describió en el apartado 4.7.2.

4.7.4. *Expresión de los resultados*

La señal luminiscente fue registrada en términos de “unidades relativas de luminiscencia” (RLU). El efecto del agonista, en una concentración determinada, sobre la $[Ca^{2+}]_i$ es proporcional a la altura del pico generado por su inyección. Este efecto se expresa en terminos de RLU y se calcula mediante la sustracción de la luminiscencia basal (RLU_{Basal A}) -registrada antes de la inyección de agonista- al valor de RLU máximo del pico

obtenido al inyectar el agonista ($RLU_{Max A}$). El valor resultante ($RLU_{Neta A} = RLU_{Max A} - RLU_{Basal A}$) fue normalizado respecto de la luminiscencia total del sistema ($RLU_{Neta T}$) para poder independizarnos de las diferencias en la eficiencia de transfección y/o el número de células/pocillo. $RLU_{Neta T}$ resulta de la sumatoria de $RLU_{Neta A}$ y la luminiscencia máxima adicional registrada luego de la lisis celular, corregida por su valor basal ($RLU_{Neta L} = RLU_{Max L} - RLU_{Basal L}$). Por lo tanto, los valores corregidos al cabo del tratamiento de las células con agonista se expresaron en términos de “fracción de luminiscencias” (L_f) mediante la expresión $L_f = RLU_{Neta A} / RLU_{Neta T} = RLU_{Neta A} / (RLU_{Neta A} + RLU_{Neta L})$; es decir: $L_f = (RLU_{Max A} - RLU_{Basal A}) / (RLU_{Max A} - RLU_{Basal A} + RLU_{Max L} - RLU_{Basal L})$.

En las curvas concentración-respuesta para el agonista, los valores de L_f fueron expresados como L_f porcentual respecto al obtenido con una concentración 1×10^{-2} M de agonista (efecto máximo). En las curvas concentración-respuesta para el antagonista, los valores de L_f fueron expresados como L_f porcentual respecto al efecto producido por carbacol ($10 \mu\text{M}$ final) en ausencia de antagonista. En los ensayos que evaluaron efecto del carbacol sobre células preincubadas con la fracción IgG o los fragmentos Fab, los registros fueron expresados como L_f porcentual respecto al valor control (efecto de carbacol sobre células preincubadas con BR, en ausencia de inmunoglobulinas o fragmentos Fab).

4.8. Monitoreo de la interacción RM_2 /arrestina-2 en células vivas

4.8.1. Preparación del sistema celular BRET

Células HEK 293T cultivadas en placas de 12 pocillos fueron transfectadas de manera transitoria con las construcciones componentes del par BRET (RM_2 -RLuc y Arr-2-YFP), en presencia o ausencia de la construcción GRK2, cuyas cantidades relativas dependieron del protocolo utilizado (sección 4.8.4). La cantidad total de ADN plasmídico en cada cocktail de transfección fue mantenida en $3 \mu\text{g}$ de ADN, utilizando un plásmido *carrier* (CS2+). Al cabo de 48 h, las células fueron lavadas dos veces con PBS tibio y resuspendidas en $800 \mu\text{l}$ de buffer KRHA (ver composición en la sección 4.5.1).

4.8.2. Monitoreo de los niveles de expresión de las construcciones transfectadas: mediciones de fluorescencia total y luminiscencia total

Los niveles de expresión de las proteínas RM₂-YFP y RM₂-RLuc fueron respectivamente monitoreados mediante la determinación de los valores de fluorescencia total y luminiscencia total en los distintos lotes de células transfectadas. Para ello, se dispensaron 20.000 células contenidas en 90 µl de suspensión celular en pocillos individuales de una placa de 96 pocillos (matriz negra, fondo plano y transparente) (NUNC, Thermo Scientific, Rochester, NY, USA) y se midió la intensidad de fluorescencia utilizando un filtro de excitación de 485 nm y un filtro de emisión de 520 nm. A continuación, las células fueron transferidas a una placa blanca opaca con fondo en "U" de 96 pocillos (Wallac, Perkin Elmer, Boston, MA, USA). Tras la adición de 10 µl de solución de celenteracina h/pocillo (5 µM final), las placas fueron incubadas durante 15 min a 25°C.

Para una suspensión celular coexpresando un determinado par BRET, la fluorescencia total registrada ($F_{\text{par BRET}}$) fue normalizada por la fluorescencia basal de células transfectadas con el vector plasmídico *carrier* (CS₂₊) ($F_{\text{CS2+}}$) según la ecuación $F = F_{\text{par BRET}}/F_{\text{CS2+}}$. Este valor de fluorescencia total normalizada es directamente proporcional a los niveles de expresión de RM₂-YFP e independiente de la autofluorescencia inespecífica generada por las células y la placa.

Por otro lado, a la luminiscencia total registrada para la misma suspensión celular ($L_{\text{par BRET}}$) se le sustrajo el valor de luminiscencia basal de células transfectadas con plásmido *carrier* ($L_{\text{CS2+}}$). Por lo tanto, $L = L_{\text{par BRET}} - L_{\text{CS2+}}$. Se definió el cociente entre fluorescencia y luminiscencia de un par BRET como $F/L = (F_{\text{BRET}}/F_{\text{CS2+}})/(L_{\text{BRET}} - L_{\text{CS2+}})$

Tanto la luminiscencia como la fluorescencia fueron medidas en el fluoroluminómetro de placa utilizado previamente (ver sección 4.7.2) [101].

4.8.3. Detección de la interacción RM₂/Arr-2 mediante BRET

Cuarenta microlitros de suspensión de células transfectadas (20.000 células/pocillo), fueron preincubadas (o no) con fracciones IgG o Fab, y luego tratadas con 50 µl de solución de KRHA o carbacol, según las concentraciones y tiempos propios de cada protocolo. Quince minutos antes de concluida la reacción se agregaron 10 µl de solución de celenteracina h (5 µM final) y se completó la incubación a TA en el interior del fluoroluminómetro. Luego se determinó la señal BRET, registrando la integración secuencial de luminis-

cencia en los rangos 445-505 nm y 505-565 nm en el fluoroluminómetro. Los datos obtenidos fueron expresados como 'relación BRET' o como cambios netos en la relación BRET luego del tratamiento con ligandos muscarínicos, IgGs humanas o sus fragmentos Fab, se expresaron como Δ BRET en unidades miliBrets (mB) según se definió en la sección 4.5.3.

4.8.4. Tratamiento de las células con ligandos muscarínicos y/o anticuerpos

a) *Efecto del carbacol sobre la interacción RM₂/Arr-2. Titulación de las proteínas componentes del par BRET:* Células HEK 293T fueron transfectadas con una cantidad constante de la construcción RM₂-RLuc (0,5 μ g) y cantidades crecientes de la construcción Arr-2-YFP (0,1-3,0 μ g), en presencia y ausencia de GRK2 (0,5 μ g). Al cabo de 48 h, las células fueron resuspendidas en KRHA e incubadas a 25°C en presencia y ausencia del agonista carbacol (10 μ M). En base a las curvas de saturación BRET (Δ BRET vs F/L) se evaluó: a) el requerimiento de GRK2 sobreexpresada para detectar el reclutamiento de Arr-2 al RM₂; b) La relación F/L óptima para poder detectar un rango de Δ BRET adecuado en los ensayos de inhibición subsiguientes, comprendido entre el BRET₅₀ y los valores de F/L correspondientes a niveles saturantes de Δ BRET (BRET_{max}).

b) *Efecto del carbacol sobre la interacción RM₂/Arr-2. Curvas de concentración y de tiempo:* Células HEK 293T expresando transitoriamente RM₂-RLuc y Arr-2-YFP en una relación F/L=0.15-0.20, con o sin sobreexpresión de GRK2, fueron resuspendidas en KRHA y tratadas con carbacol (10 μ M) a distintos tiempos (0-30 minutos) o con diferentes concentraciones de carbacol a TA, durante 20 minutos. En base a los ensayos cinéticos se obtuvieron curvas (Δ BRET vs tiempo) y se determinó el tiempo óptimo de reacción. Por su parte, las curvas (Δ BRET vs concentración de agonista) permitieron determinar el E_{max} y la EC₅₀, así como la concentración óptima de agonista a utilizar en posteriores ensayos de inhibición.

c) *Efecto del carbacol sobre la interacción RM₂/Arr-2 en presencia de las fracciones IgG/Fab de pacientes chagásicos con disautomía o controles:* Células HEK 293T expresando RM₂-RLuc y Arr-2-YFP (en una relación F/L= 0,15-0,2) y GRK2 fueron preincubadas durante 30 minutos con diferentes concentraciones de IgG ChD, IgG Control, o sus respectivos fragmentos Fab. Posteriormente, las células fueron tratadas a TA con carbacol (10 μ M) durante 30 min. Luego se construyeron curvas " Δ BRET vs concentración de IgG/Fab", y se evaluó la capacidad de cada fracción para modular el efecto del agonista sobre el reclutamiento de Arr-2 al RM₂.

d) *Efecto directo de IgG ChD sobre la interacción RM₂/Arr-2*: Células HEK 293T expresando RM₂-RLuc y Arr-2-YFP (en una relación F/L= 0,15-0,2) y GRK2 fueron resuspendidas en KRHA e incubadas durante 30 o 60 minutos con la fracción IgG ChD o Control (10 µM) a TA.

4.9. Internalización de RM₂

Células HEK 293T crecidas en placas de 10 cm fueron transfectadas de manera transitoria con FLAG-RM₂ humano solo o conjuntamente con GRK2 y una arrestina no visual marcada (Arr-2-YFP o Arr-3-FLAG) utilizando el método de precipitación con fosfato de calcio. Treinta y seis horas después de la transfección, se realizó un split y las células fueron sembradas en placas de 12 pocillos e incubadas por otras 24 hs. Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces con PBS tibio, y luego de agregar medio DMEM incompleto a cada pocillo, las mismas fueron tratadas con buffer PBS, diferentes concentraciones de carbacol (1×10^{-9} - 1×10^{-3} M) o la fracción IgG ChD o IgG Control (15, 25 o 50 µM) durante 60 minutos a 37°C.

A continuación, las placas se colocaron sobre hielo y las células fueron lavadas dos veces con PBS helado. La densidad de receptores muscarínicos superficiales fue determinada mediante ensayos de unión de ligandos, en los cuales las células fueron incubadas con el ligando muscarínico hidrofílico N-metilescopolamina ($[^3\text{H}]$ -NMS), en concentración saturante (1nM), durante 4 h a 4°C. Finalmente, las células fueron lavadas dos veces con PBS helado y solubilizadas en 0,25 ml de solución de Triton X-100 1%. Las soluciones resultantes fueron transferidas a viales de polipropileno (Polistor, Buenos Aires) conteniendo 3,5 ml de solución centelleadora (OptiPhase HiSafe, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) y la radiactividad retenida fue medida en un contador de centelleo líquido (Tri-Carb 2800 TR, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). La cantidad de proteína celular contenida en los pocillos de cada placa fue determinada mediante el método de Lowry [193] y la densidad de sitios de unión fue expresada en fmol/mg de proteína celular. Los niveles de receptores superficiales se expresaron como %, respecto del valor control, en ausencia de agonista o anticuerpos. En consecuencia, el porcentaje de receptores internalizados fue equivalente a "100 - % de receptores superficiales remanentes".

4.10. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida-SDS

Las fracciones a analizar (suero entero, IgG, Fc+IgG o Fab) fueron convenientemente disueltas en buffer Muestra (BM) [Tris-HCl 0,0625M; pH 6,8; SDS 1%; glicerol 10% (V/V); azul de bromo fenol 0,01%] y tratadas durante 5 min a 95°C. Luego, las muestras proteicas fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) mediante el sistema discontinuo propuesto por Laemmli [196], empleando un gel separador con 8% de poliacrilamida [Acrilamida/bisacrilamida (30:0,8); 8% T; Tris-HCl 0,375M; pH 6,8; persulfato de amonio 0,075%; TEMED 0,075% (v/v)]. El proceso fue llevado a cabo mediante un sistema de electroforesis vertical Mini-Protean 3 Cell (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), utilizando geles planos de 1,5 mm de espesor preparados entre placas de vidrio (8 x 7,3 cm). El sistema discontinuo estaba formado por un gel separador (6,5 ml) y un gel concentrador (3,5 ml). Cada gel constaba de 10 carriles, siendo el máximo volumen de muestra a sembrar de 30 µl/carril.

La electroforesis de las proteínas a través del gel concentrador se realizó a un voltaje constante= 55 V durante 30-45 min, mientras que el fraccionamiento electroforético de las mismas se llevó a cabo a un voltaje constante= 100V durante 60-90 min. Concluido el proceso electroforético, las proteínas fueron teñidas con Azul Brillante de Coomasie R-250, embebiendo los geles en una solución del colorante 0,25% en etanol/ácido acético glacial/agua (45:10:45) durante 90 min a TA. Posteriormente, los geles fueron decolorados con solución metanol/ácido acético glacial/agua (40:5:55) durante 18-22 horas a TA. Las imágenes fotográficas de los geles luego de la tinción fueron registradas mediante una cámara digital DSC-H50 (Sony Electronics, San Diego, CA, USA).

4.11. Análisis estadístico

Características clínicas y reactividad serológica de los pacientes estudiados: las variables continuas se expresaron como medianas (rango intercuartil) y fueron comparadas estadísticamente según el test de Kruskal-Wallis seguido de un test de Dunn para comparaciones múltiples. Por otro lado, las variables categóricas se expresaron como número de pacientes (%) y se compararon por el test de Chi cuadrado. El análisis de correlación entre variables continuas se analizó mediante el método de regresión lineal y la correspondiente ecuación se obtuvo por el método de cuadrados mínimos.

Datos experimentales: los datos se expresan como el promedio \pm error standard de la media (ESM).

En las curvas de titulación BRET (Relación BRET vs log F/L) los datos fueron ajustados mediante regresión no lineal a un modelo sigmoideo de un solo sitio o mediante regresión lineal en ausencia de convergencia para el modelo sigmoideo. Las curvas de saturación BRET derivadas de las curvas anteriores (Δ BRET vs F/L) fueron analizadas utilizando una ecuación de regresión no lineal, asumiendo un solo sitio de unión. Las curvas de tiempo de tratamiento con agonista fueron analizadas mediante un modelo de regresión no lineal según una cinética de asociación de pseudo-primer orden. Las curvas concentración de agonista vs respuesta fueron analizadas mediante un modelo de regresión no lineal para una función sigmoidea de 4 parámetros (pendiente variable). Las curvas de inhibición del efecto de un agonista por un antagonista fueron analizadas mediante un modelo de regresión no lineal con pendiente variable.

En los ensayos donde se evalúa el efecto de los Acs anti-RM₂ sobre la interacción receptor/receptor, la señalización dependiente de proteína G o el reclutamiento de Arr-2 al RM₂, los tratamientos fueron sometidos a una prueba de análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, seguido del test *post hoc* de Newman-Keuls, o ANOVA de dos factores del test *post hoc* de Bonferroni, según el caso.

El análisis estadístico fue realizado mediante la utilización del programa Prism 5 (Graph Pad, La Jolla, CA, USA). En todos los casos las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

PRIMERA PARTE: "Modulación de la interacción receptor/receptor por Acs anti-RM2 de pacientes chagásicos con disautonomía"

5.1. Caracterización clínica e inmunoserológica de los pacientes

En primer lugar, caracterizamos a los pacientes cuyos anticuerpos circulantes fueron nuestro objeto de estudio. Se seleccionaron 3 grupos de pacientes: Grupo 1: chagásicos crónicos con disautonomía cardiovascular (ChD); Grupo 2: chagásicos crónicos no disautonómicos (ChND); Grupo 3: no chagásicos, no disautonómicos (Control). La Tabla 2 resume los datos clínicos y serológicos de los pacientes chagásicos y controles. El promedio de edad global fue de 55 años (rango intercuartil= 20 años) y dos tercios de los pacientes estudiados eran mujeres. La edad y el sexo fueron similares en los 3 grupos estudiados. Si bien se registraron 3 pacientes con bradicardia sinusal (<60 lpm) en el grupo 1, la frecuencia cardíaca mediana no resultó significativamente diferente en los 3 grupos. Tampoco se encontraron diferencias intergrupales en términos de presión arterial (sistólica o diastólica).

Por otra parte, se evaluó la reactividad de los sueros de los pacientes chagásicos y controles contra el 2do *loop* extracelular (II-LEC) del RM₂ mediante ELISA. Los pacientes del grupo 1 exhibieron una mayor prevalencia de Acs anti-RM₂ con respecto a los grupos 2 y 3 (93%, 13% y 0%, respectivamente), confirmando la asociación entre Acs anti-RM₂ y disautonomía en los pacientes chagásicos crónicos estudiados ($p < 0,0001$).

La caracterización clínica e inmunoserológica de los pacientes nos permitió identificar a los pacientes seropositivos y seronegativos para Acs anti-RM₂ y determinar los niveles séricos de estos Acs en función de los experimentos subsiguientes. Las fracciones IgG séricas de todos los pacientes fueron purificadas y utilizadas a lo largo de este estudio para caracterizar su actividad farmacológica.

5.2. Caracterización del efecto de la fracción IgG de pacientes chagásicos disautonómicos sobre la interacción RM₁/RM₂ en células vivas.

La primera parte de este trabajo está dedicada a evaluar la capacidad de los Acs anti-RM₂ séricos de pacientes chagásicos crónicos con disautonomía para modular la inte-

Tabla 2. Características clínicas y serológicas de los pacientes en estudio

	Grupo 1 ChD	Grupo 2 ChND	Grupo 3 Control	<i>p</i>
n	15	15	15	
Edad (años)	56 (42-66)	56 (44-63)	54 (38-62)	0,55
Género (mujeres/hombres)	11/4	10/5	9/6	0,74
Frecuencia cardíaca (latidos/min)	60 (50-65)	60 (50-70)	63 (60-70)	0,07
Presión arterial sistólica (mm Hg)	120 (110-140)	110 (100-130)	110 (100-120)	0,18
Presión arterial diastólica (mm Hg)	80 (60-80)	60 (60-80)	70 (60-80)	0,13
Reactividad sérica contra el RM ₂ (II-LEC) ¹				
Sueros positivos (%)	14 (93)*	2 (13)	0 (0)	0,0001

Se evaluaron las características clínicas y la reactividad sérica en pacientes chagásicos con y sin disfunción autonómica cardiovascular (ChD/ChND), así como en pacientes no chagásicos, no disautonómicos (Control). Las variables continuas se expresaron como medianas (rango intercuartil) y se compararon mediante el test de Kruskal-Wallis. Las variables categóricas se muestran como número de pacientes (%) y se comparan mediante el test Chi-cuadrado. ¹La reactividad contra el segundo *loop* extracelular (II-LEC) del receptor muscarínico de acetilcolina M₂ (RM₂) presente en el suero de cada paciente (dilución 1/50) fue determinada por ELISA, considerándose positivo para anticuerpos anti-RM₂ a todo suero cuya densidad óptica (DO) fuera superior al valor de corte (VC), siendo VC= DO_{405nm} promedio de los sueros del Grupo 3 (Control) + 2DS. * Significativamente diferente de los grupos 2 y 3.

racción entre RM₂ expresados en la membrana plasmática de células vivas. La detección de la interacción RM₂/RM₂ fue monitoreada utilizando un sistema BRET previamente caracterizado [100]. Este sistema está compuesto por dos proteínas de fusión: RM₂-RLuc y RM₂-YFP. Al coexpresar ambas proteínas en células HEK 293T puede detectarse transferencia de energía en resonancia (BRET) entre RLuc e YFP por luminometría, en presencia del sustrato celenteracina h. Dado que BRET ocurre cuando la distancia entre RLuc e YFP es $\leq 100\text{\AA}$, y esta distancia es consistente con una interacción proteína/proteína, puede inferirse que, si RLuc interacciona con YFP, entonces los receptores fusionados a las dichas proteínas también interaccionan entre sí. Este hallazgo constituye una clara evidencia que los RM₂ forman homooligómeros constitutivos en células vivas [100].

En este proyecto, las células HEK 293T fueron cotransfectadas con RM₂-RLuc y RM₂-YFP en una relación de ADN plasmídico 1:2 o 1:3, logrando así una expresión equimolar de ambas proteínas de fusión [197]. Bajo estas condiciones, las células transfectadas generaban una señal basal de BRET de 50-65 mB, consistente con la formación de homooligómeros constitutivos del RM₂ [100]. Mediante ensayos de unión del radioligando [³H]-QNB se determinó que el número de total de RM₂ expresados en células HEK 293T en los diferentes experimentos variaba entre 140 y 350 fmol/mg de proteína celular. Estos valores se encuentran dentro del rango de niveles de expresión fisiológicos de los RM₂ [67, 198].

Una vez caracterizado el sistema BRET, se evaluó el efecto de la fracción IgG de pacientes chagásicos con disautonomía (IgG ChD) sobre la interacción RM₂/RM₂. Células HEK 293T cotransfectadas con el par BRET RM₂-RLuc/RM₂-YFP fueron resuspendidas en buffer Krebs-Ringer-HEPES suplementado con seroalbúmina bovina (BSA) 0,1% (KHRA) y tratadas posteriormente con IgG ChD o IgG de individuos controles (IgG Control) en una concentración 50 μM durante diferentes tiempos, o bien con diferentes concentraciones de las mismas IgG durante 1 h a temperatura ambiente (TA). La fracción IgG ChD promovió un incremento de la interacción RM₂/RM₂ dependiente del tiempo de tratamiento (Figura 8A) y de la concentración de IgG (Figura 8B), mientras la fracción IgG Control no logró generar un efecto diferente del valor basal (buffer KRHA solo). Analizando las curvas de concentración y de tiempo, el máximo incremento de la interacción RM₂/RM₂ detectado fue de $13,1 \pm 0,9$ mB. Este efecto se logró con una concentración final

de IgG ChD de 50 μM y un tiempo de incubación 60 min (Figura 8, A y B). No se encontraron diferencias significativas en los valores de ΔBRET entre 30 y 60 min.

Puede apreciarse en la curva concentración-respuesta que los efectos obtenidos no alcanzan, aparentemente, valores de saturación (Figura 8B). Sin embargo, el empleo de concentraciones de IgG superiores a 50 μM hubiera implicado un alejamiento del rango de concentraciones fisiológicas (50-70 μM) y, adicionalmente, la detección de una señal BRET inespecífica generada por una concentración excesiva de inmunoglobulina en el medio (datos no mostrados). En conclusión, en los sucesivos experimentos hemos utilizado concentraciones de IgG no superiores a 50 μM y tiempos de incubación entre 30 y 60 min. Estas son, a nuestro juicio, las condiciones óptimas de trabajo en nuestros experimentos de BRET, las cuales nos han permitido monitorear la interacción RM_2/RM_2 con un adecuado balance de sensibilidad y especificidad.

Al analizar la Figura 8B, notamos que la fracción IgG ChD en concentración 10 μM es incapaz de generar valores de ΔBRET significativamente diferentes a los obtenidos en presencia de IgG Control, en la misma concentración. Por lo tanto, decidimos investigar la influencia de la concentración total de IgG sobre la señal BRET. Para ello, células expresando el par BRET $\text{RM}_2\text{-RLuc}/\text{RM}_2\text{-YFP}$ fueron incubadas con diferentes concentraciones de IgG ChD en presencia de cantidades suplementarias de IgG Control, manteniendo una concentración final de IgG total = 50 μM . En estas condiciones, IgG ChD 10 μM (suplementada con IgG Control 40 μM) promovió un incremento significativo de la señal BRET ($p < 0,05$) (Figura 8B). Estos datos sugieren que el exceso de una inmunoglobulina carente de especificidad por el antígeno es capaz de actuar como una proteína *carrier*, favoreciendo la interacción de los Acs anti- RM_2 con su receptor blanco cuando estos Acs se encuentran en bajas concentraciones.

En relación a la especificidad de la proteína *carrier* en nuestros ensayos BRET, comparamos el efecto *carrier* de la fracción IgG Control con los potenciales efectos *carrier* de IgG total de cabra o seroalbúmina bovina (BSA). Brevemente, el tratamiento de nuestro sistema celular BRET $\text{RM}_2\text{-RLuc}/\text{RM}_2\text{-YFP}$ con IgG ChD 10 μM suplementada con IgG de cabra 40 μM promovió un incremento de la señal BRET, a diferencia de IgG Control 10 μM suplementada con 40 μM de IgG de cabra o IgG ChD 10 μM sola, las cuales no exhibieron valores de significativos de ΔBRET respecto del valor basal (Tabla 3 y Figura 8B).

En idénticas condiciones experimentales, el agregado de cantidades suplementarias de BSA no logró incrementar el efecto de la IgG ChD 10 μM sobre la señal BRET (Tabla 3).

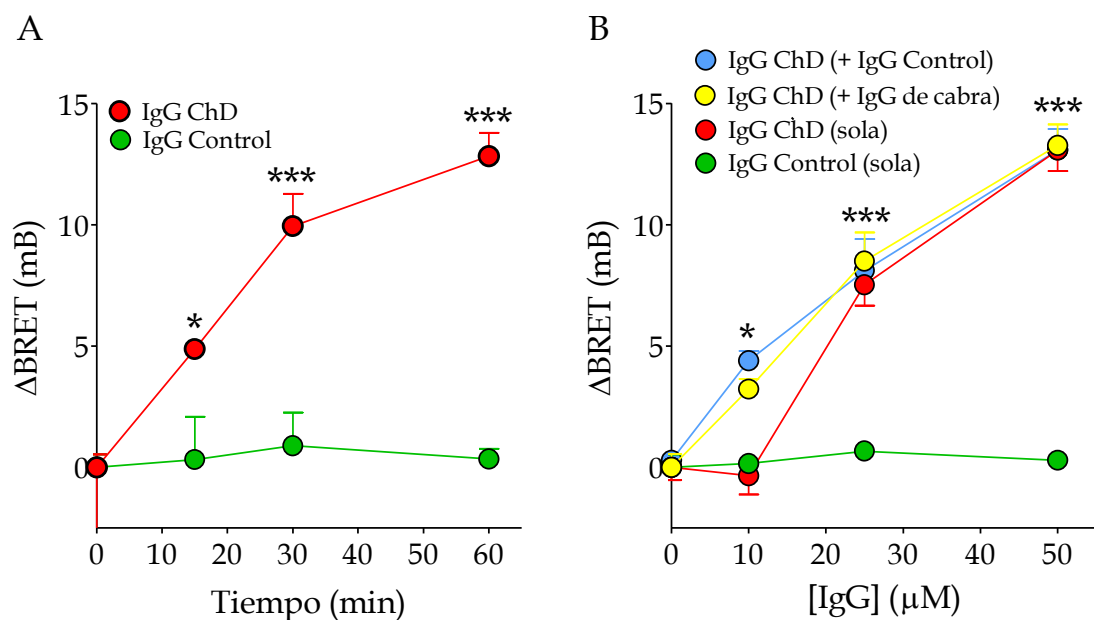


Figura 8. Efecto de IgG ChD sobre la interacción RM₂/RM₂ en células vivas. Dependencia del tiempo y la concentración. Células HEK 293T coexpresando las proteínas de fusión RM₂-Luciferasa de Renilla (RM₂-RLuc) y RM₂-proteína fluorescente amarilla (RM₂-YFP) fueron tratadas con las fracciones IgG séricas de pacientes chagásicos con disautonomía (IgG ChD) o de individuos controles (IgG Control) (50 μM) a diferentes tiempos (*Panel A*) o con diferentes concentraciones de cada fracción de inmunoglobulinas durante 60 min a temperatura ambiente (TA) (*Panel B*). Alternativamente, las células fueron incubadas durante 60 min en presencia de diferentes concentraciones de IgG ChD y cantidades suplementarias de IgG Control o IgG de cabra, manteniendo una concentración total de IgG = 50 μM (*Panel B*). Las determinaciones de BRET se efectuaron 15 min después del agregado de celenteracina h (5 μM final). Los cambios netos en la relación BRET en presencia de inmunoglobulinas fueron expresados como “ΔBRET” (ver sección 4.5.3). Se indican valores promedio ± ESM de las fracciones IgG de 3-6 pacientes chagásicos con disautonomía o individuos controles obtenidos en al menos 5-7 experimentos independientes en cada caso. (*) y (**): Diferencias significativas respecto de IgG Control en igual concentración, con $p < 0,05$ y $p < 0,001$ respectivamente.

Este resultado era de esperarse, ya que la presencia de la proteína BSA (20 μ M) en el buffer de resuspensión utilizado en el ensayo (KRHA) no conduce a un incremento de la señal de BRET en presencia de IgG ChD 10 μ M. Estos resultados indican que la IgG de cabra, pero no BSA, es capaz de reproducir el efecto *carrier* de IgG Control. Si bien los resultados sugieren que este efecto es específico de una inmunoglobulina G, sería necesario evaluar otras proteínas con diferentes propiedades físicoquímicas para poder definir la especificidad de la proteína *carrier*.

5.3. Caracterización del efecto modulador de la fracción IgG ChD sobre la interacción RM₂/RM₂ en membranas celulares.

Para determinar si la actividad moduladora de la IgG ChD sobre la interacción RM₂/RM₂ requería de la integridad celular, evaluamos el efecto de esta fracción de Acs sobre membranas crudas obtenidas de células coexpresando el par BRET RM₂-RLuc/RM₂-YFP. Como puede observarse en la Figura 9, la fracción IgG ChD fue capaz de inducir un incremento de la señal de BRET dependiente de la concentración de IgG, comparable al obtenido en células vivas.

Si bien el efecto de IgG ChD 10 μ M sobre la señal de BRET es mayor que la promovida por la IgG Control a la misma concentración, los valores no son estadísticamente diferentes. Sin embargo, se observó un incremento significativo de la transferencia de energía cuando las células HEK 293T eran tratadas con 10 μ M de IgG ChD en presencia de 40 μ M de IgG Control, en comparación con la IgG Control sola (datos no mostrados).

Estos resultados sugieren que el efecto de la IgG ChD sobre la interacción RM₂/RM₂ no requiere de la integridad celular y ocurre al nivel de la membrana plasmática.

5.4. Modulación de la interacción RM₂/RM₂ por IgG ChD: Especificidad de la molécula de receptor

Seguidamente, investigamos si el incremento de la interacción receptor-receptor inducido por IgG ChD es específico del RM₂. Por lo tanto, analizamos la capacidad de esta fracción de anticuerpos para modular la transferencia de energía en resonancia en un sistema BRET que presentara uno o ambos protómeros diferentes al RM₂. De este modo, se eligieron 3 sistemas BRET (a: RM₃-RLuc/RM₃-YFP, b: RM₃-RLuc/RM₂-YFP, c: RM₂-RLuc/RM₃-YFP) y se evaluaron los efectos de IgG ChD sobre la señal BRET, utilizando al

Tabla 3. Efecto de la IgG ChD sobre la interacción RM₂/RM₂ en células intactas. Especificidad de la proteína carrier

Tratamiento	Δ BRET (mB)
IgG ChD sola 10 μ M	-0.4 \pm 0.8
IgG Control sola 10 μ M	0.2 \pm 0.3
IgG ChD 10 μ M + IgG Control 40 μ M	4.4 \pm 0.4 ^{***} /#
IgG Control sola 50 μ M	0.3 \pm 0.3
IgG ChD 10 μ M + IgG de cabra 40 μ M	3.2 \pm 0.4 ^{**} /#
IgG Control 10 μ M + IgG de cabra 40 μ M	-4.1 \pm 0.8
IgG ChD 10 μ M + BSA 40 μ M	0.3 \pm 1.4
IgG Control 10 μ M + BSA 40 μ M	-1.2 \pm 1.9

Células HEK 293T coexpresando RM₂-RLuc y RM₂-YFP fueron tratadas durante 60 min con IgG ChD o IgG Control 10 μ M en presencia o ausencia de cantidades suplementarias de IgG Control, IgG de cabra o seroalbúmina bovina (BSA), manteniendo una concentración total de proteína de 50 μ M. Las determinaciones de BRET se efectuaron 15 min después del agregado de celenteracina h (5 μ M final). Los cambios netos en la relación BRET en presencia de inmunoglobulinas fueron expresados como " Δ BRET" (ver sección 4.5.3). Se indican valores promedio \pm ESM de las fracciones IgG de 3-5 pacientes ChD o individuos controles obtenidos en al menos 3 experimentos independientes. Diferencias significativas: (^{***}) *versus* IgG Control 50 μ M, con $p < 0,001$; (#) *versus* IgG Control 10 μ M or IgG ChD 10 μ M, con $p < 0,05$; (^{**}) *versus* IgG Control 10 μ M + IgG de cabra 40 μ M, con $p < 0,01$.

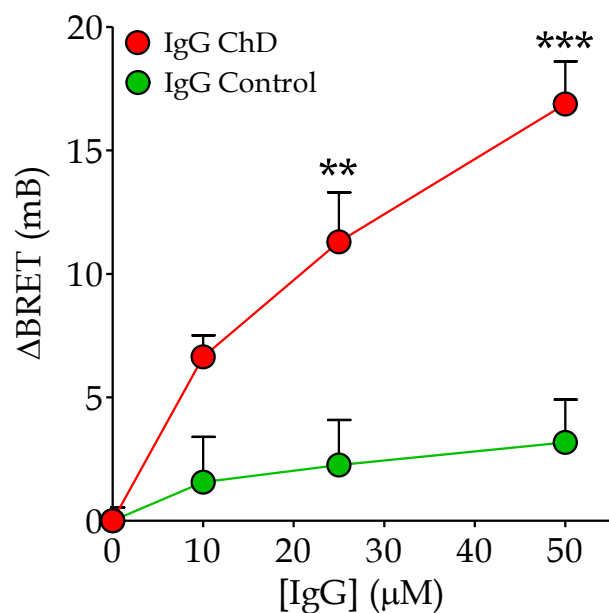


Figura 9. Efecto de IgG ChD sobre la interacción RM_2/RM_2 en membranas celulares. Membranas crudas preparadas a partir de células HEK 293T expresando el par BRET RM_2 -RLuc/ RM_2 -YFP fueron tratadas con diferentes concentraciones de IgG ChD o IgG Control durante 60 min a TA. Las determinaciones de BRET se efectuaron 15 min después del agregado de celenteracina h (5 μ M final). Los cambios netos en la relación BRET en presencia de inmunoglobulinas fueron expresados como “ Δ BRET” (ver sección 4.5.3). Se indican valores promedio \pm ESM de la fracción IgG de 3-5 pacientes chagásicos con disautonomía o individuos controles obtenidos en al menos 3 experimentos independientes. (**) y (***): Diferencias significativas respecto de IgG Control, con $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente.

sistema RM₂-RLuc/RM₂-YFP como control positivo (d).

La coexpresión de los diferentes pares BRET generó una señal BRET basal en todos los casos, obteniéndose valores de $59,2 \pm 2,2$ mB, $56,2 \pm 4,5$ mB, $62 \pm 2,2$ mB y $68,5 \pm 2,6$ mB para los sistemas BRET a, b, c y d, respectivamente. Esta interacción receptor-receptor basal es congruente con la formación de oligómeros constitutivos, según se demostró en trabajos previos: homodímeros de RM₃ (a) o RM₂ (d), o heterodímeros RM₂/RM₃ (b,c) [100]. Luego del tratamiento con IgG ChD 50 μ M durante 60 min a TA, el par control RM₂-RLuc/RM₂-YFP generó un incremento adicional de la señal BRET (Δ BRET). Sin embargo, la fracción IgG ChD resultó inefectiva en los sistemas BRET a, b y c, dado que los niveles de Δ BRET en presencia de IgG ChD fueron similares a aquellos obtenidos en presencia de IgG Control (Figura 10). Estos resultados sugieren que el efecto de IgG ChD es específico para el RM₂.

5.5. Modulación de la interacción RM₂/RM₂ en células vivas: Comparación entre IgG ChD y ligandos muscarínicos clásicos.

Como se mencionó en la introducción, los Acs anti-RM₂ presentes en el suero de los pacientes chagásicos: a) activan al RM₂, exhibiendo un comportamiento farmacológico semejante al de un agonista muscarínico parcial [169, 170, 178, 181, 192], b) inhiben la unión específica de antagonistas muscarínicos a dicho receptor y c) interaccionan directamente con su receptor blanco uniéndose al sitio alostérico común EDGE en el II-LEC. Para poder dilucidar si la capacidad de los Acs anti-RM₂ para modular la interacción RM₂/RM₂ está determinada por su actividad muscarínica, comparamos el efecto de la IgG ChD con el de ligandos muscarínicos ortostéricos y alostéricos convencionales sobre el sistema BRET RM₂-RLuc/RM₂-YFP.

Se seleccionaron 4 ligandos muscarínicos no selectivos: un agonista total (carbacol), un agonista parcial (pilocarpina), un antagonista competitivo (atropina) y un modulador alostérico (galamina). Brevemente, células HEK 293T expresando el par BRET RM₂-RLuc/RM₂-YFP fueron tratadas con carbacol, pilocarpina o atropina en concentraciones 1 o 10 μ M y con galamina 10 o 100 μ M durante una hora a TA. La elección de estas concentraciones está basada en estudios previos, según los cuales carbacol y pilocarpina (5 μ M) ejercen efectos sobre la señalización dependiente de proteína G comparables a los efectos máximos de IgG ChD, mientras que concentraciones similares de atropina bloquean com-

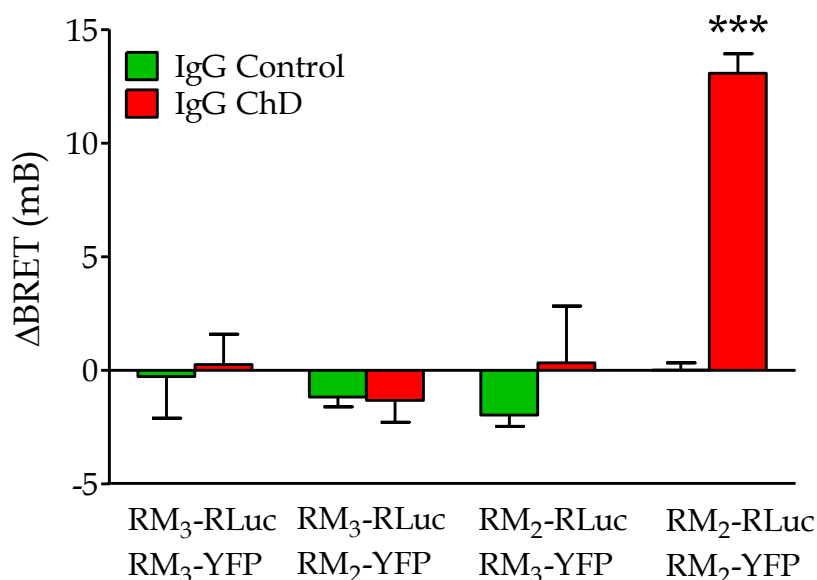


Figura 10. Efecto de la IgG ChD sobre la interacción RM₂/RM₂. Especificidad de la molécula de receptor. Células HEK 293T expresando diferentes pares BRET (RM₃-RLuc/RM₃-YFP, RM₃-RLuc/RM₂-YFP, RM₂-RLuc/RM₃-YFP o RM₂-RLuc/RM₂-YFP), en proporción equimolar, fueron incubadas con IgG ChD o IgG Control (50 μM) durante 60 min a TA. Las determinaciones de BRET se efectuaron 15 min después del agregado de celenteracina h (5 μM final). Los cambios netos en la relación BRET en presencia de inmunoglobulinas fueron expresados como “ΔBRET” (ver sección 4.5.3). Las barras representan valores promedio ± ESM de las fracciones IgG de 5 pacientes chagásicos con disautonomía o individuos controles obtenidos en al menos 5-7 experimentos independientes para cada par BRET. (***) : Diferencias significativas respecto de otros pares BRET tratados con IgG Control o IgG ChD, con $p < 0,001$.

pletamente estos efectos [178, 183]. Las concentraciones de galamina utilizadas son congruentes con las necesarias para inhibir la activación del RM_2 y la señalización dependiente de proteína G estimuladas por carbacol [199-201].

Como se muestra en la Figura 11, los ligandos muscarínicos analizados, a diferencia de la IgG ChD, fueron incapaces de modificar la señal de BRET basal (sin agregados) y sus efectos no resultaron diferentes respecto al valor de $\Delta BRET$ correspondiente al tratamiento con buffer solo (KRHA). Estos datos indican que el efecto modulador de los Acs anti- RM_2 sobre la interacción RM_2/RM_2 no resulta de su capacidad para unirse específicamente a su receptor blanco, activándolo, inactivándolo o modulando la señalización a través del mismo, como lo hacen los ligandos muscarínicos convencionales; en todo caso, sugieren que los Acs anti- RM_2 modulan la interacción entre RM_2 a través de un mecanismo particular a dilucidar, lo cual será objeto de este trabajo.

En la misma figura puede notarse una reducción no significativa de los valores de BRET en presencia de los ligandos muscarínicos analizados, principalmente a las concentraciones más altas. En particular, las leves variaciones en la transferencia de energía promovida por 10 μM de carbacol no pudieron ser antagonizados por 10 μM de atropina (Figura 12), sugiriendo que estos valores disminuidos de $\Delta BRET$ no resultan de la activación del receptor. En cambio, parecen reflejar cambios inespecíficos en la interacción constitutiva de RM_2/RM_2 , en concordancia con nuestros trabajos previos [100].

5.6. Modulación de la interacción RM_2/RM_2 en células vivas: Influencia de la activación del RM_2 por IgG ChD en presencia o ausencia de agonista

Como mencionamos anteriormente, los Acs anti- RM_2 de la fracción IgG ChD son capaces de activar al RM_2 como consecuencia de su interacción directa con dicho receptor. Más aún, evidencias recientes sugieren que los Acs anti- RM_2 pueden actuar como moduladores alostéricos positivos del RM_2 , aumentando la afinidad del agonista y potenciando su eficacia [183] (sección 1.6.10.4). Entonces, nos preguntamos si los Acs anti- RM_2 podrían generar una conformación activa particular en el RM_2 que sea capaz de modular positivamente la interacción RM_2/RM_2 , tanto en ausencia como en presencia de agonista.

Para ello células HEK 293T expresando el par BRET RM_2 -RLuc/ RM_2 -YFP fueron preincubadas durante 30 min con carbacol 10 μM , atropina 10 μM o buffer KRHA y luego tratadas durante 60 min con IgG ChD o IgG Control 50 μM a TA. Analizando la Figura 12

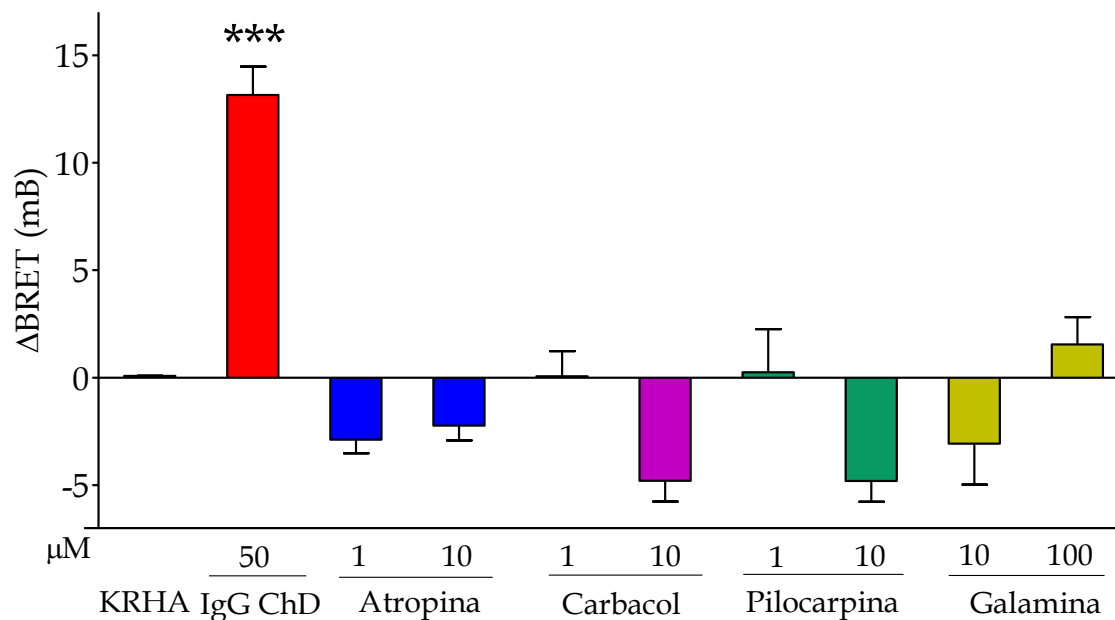


Figura 11. Efecto de ligandos muscarínicos clásicos sobre la interacción RM_2/RM_2 . Células HEK 293T expresando el par BRET RM_2 -RLuc/ RM_2 -YFP fueron tratadas durante 60 min a TA con buffer Krebs-Ringer-HEPES suplementado con BSA 0,1% (KRHA), atropina, carbacol, pilocarpina (1 o 10 μ M) o galamina (10 o 100 μ M). Como control positivo también se analizó el efecto de IgG ChD 50 μ M en las mismas condiciones. Las determinaciones de BRET se efectuaron 15 min después del agregado de celenteracina h (5 μ M final). Los cambios netos en la relación BRET en presencia de ligandos o inmunoglobulinas fueron expresados como “ Δ BRET” (ver sección 4.5.3). Las barras representan valores promedio \pm ESM obtenidos en al menos 4-6 experimentos independientes. (***) : Diferencias significativas respecto de todos los ligandos muscarínicos, con $p < 0,001$.

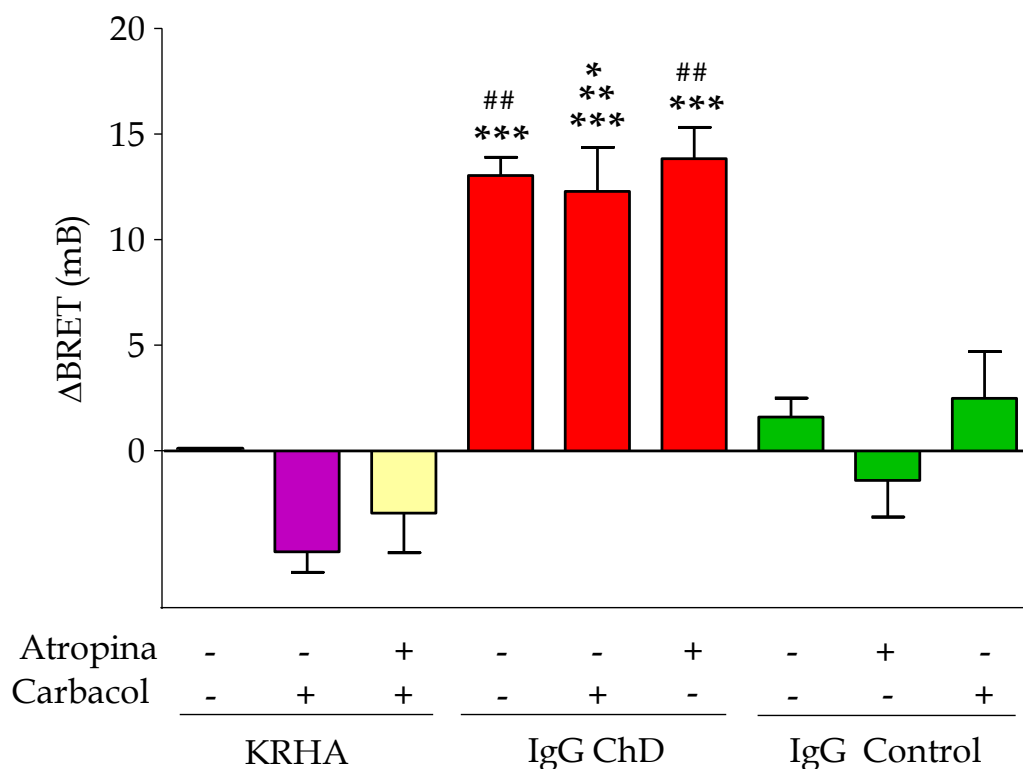


Figura 12. Modulación de la interacción RM_2/RM_2 por IgG ChD. Influencia de la activación del receptor. Células HEK 293T expresando el par BRET RM_2 -RLuc/ RM_2 -YFP fueron preincubadas en presencia o ausencia de atropina 10 μ M y/o carbacol 10 μ M durante 30 min a TA. Luego, las mismas fueron tratadas con KRHA o IgG (Control o ChD) 50 μ M durante 60 min a TA. Las determinaciones de BRET se efectuaron 15 min después del agregado de celenteracina h (5 μ M final). Los cambios netos en la relación BRET en presencia de ligandos o inmunoglobulinas fueron expresados como “ Δ BRET” (ver sección 4.5.3). Las barras representan valores promedio \pm ESM de las fracciones IgG de 3-5 pacientes chagásicos con disautonomía o individuos controles, obtenidos en al menos 3-5 experimentos independientes. Diferencias significativas: (*) respecto de IgG Control 50 μ M + Atropina 10 μ M, con $p < 0,05$; (**) respecto de IgG Control 50 μ M, con $p < 0,01$; (##) respecto de IgG Control 50 μ M + Atropina 10 μ M, con $p < 0,01$; (***) respecto de los tratamientos con KRHA o IgG Control, con $p < 0,001$.

notamos que ni la inactivación del RM₂ con atropina ni la activación del RM₂ por carbacol logran alterar el incremento en la señal BRET promovido por la fracción IgG ChD. Estos datos sugieren que el incremento en la interacción RM₂/RM₂ no es el resultado de una conformación activa del RM₂ generada a través de su interacción con los Acs anti-RM₂, o como resultado de un efecto alostérico de los anticuerpos sobre la acción del agonista.

5.7. Modulación de la interacción RM₂/RM₂ en células vivas por IgG ChD: Especificidad de epitope.

En trabajos previos se ha demostrado que la fracción de anticuerpos responsable de la actividad agonista muscarínica de la fracción IgG ChD es aquella que reconoce específicamente al 2do *loop* extracelular (II-LEC) del RM₂ humano [174-176]. En base a estos resultados, nos propusimos investigar si IgG ChD estimula la interacción RM₂/RM₂ a través de su interacción con este epitope.

Para ello, la fracción IgG monoespecífica, reactiva contra el RM₂, fue purificada mediante cromatografía de afinidad, utilizando como ligando inmovilizado un péptido sintético cuya secuencia aminoacídica corresponde al II-LEC del RM₂ humano (pM₂). El pasaje de la IgG ChD total a través de la columna conteniendo el pM₂ inmovilizado permitió aislar secuencialmente dos fracciones: la fracción no anti-pM₂ (eluída con PBS) y la fracción monoespecífica anti-pM₂ (eluída con KSCN 3M, NaCl 1M). Para evaluar la eficacia del procedimiento cromatográfico se monitoreó la inmunorreactividad contra pM₂ de ambas fracciones mediante ELISA (Figura 13, A y B). Brevemente, se realizaron ensayos de saturación, exponiendo al péptido inmovilizado a concentraciones crecientes de las fracciones IgG anti-pM₂ o IgG no anti-pM₂ previamente incubadas en presencia o ausencia de pM₂ soluble (100 μM) (Figura 13A). Alternativamente, se realizaron ensayos de inhibición, incubando ambas fracciones (0,5 μM) con diferentes concentraciones de pM₂ soluble (Figura 13B).

La fracción IgG anti-pM₂ promovió un incremento gradual de la reactividad contra el péptido inmovilizado en forma dependiente de su concentración (Figura 13A). La especificidad de esta interacción se confirmó al evidenciar una inhibición de la reactividad anti-pM₂ al preincubar las distintas diluciones de IgG anti-pM₂ con el péptido soluble, o bien al preincubar esta fracción de anticuerpos (0,5 μM) con concentraciones crecientes de péptido soluble (Figura 13B).

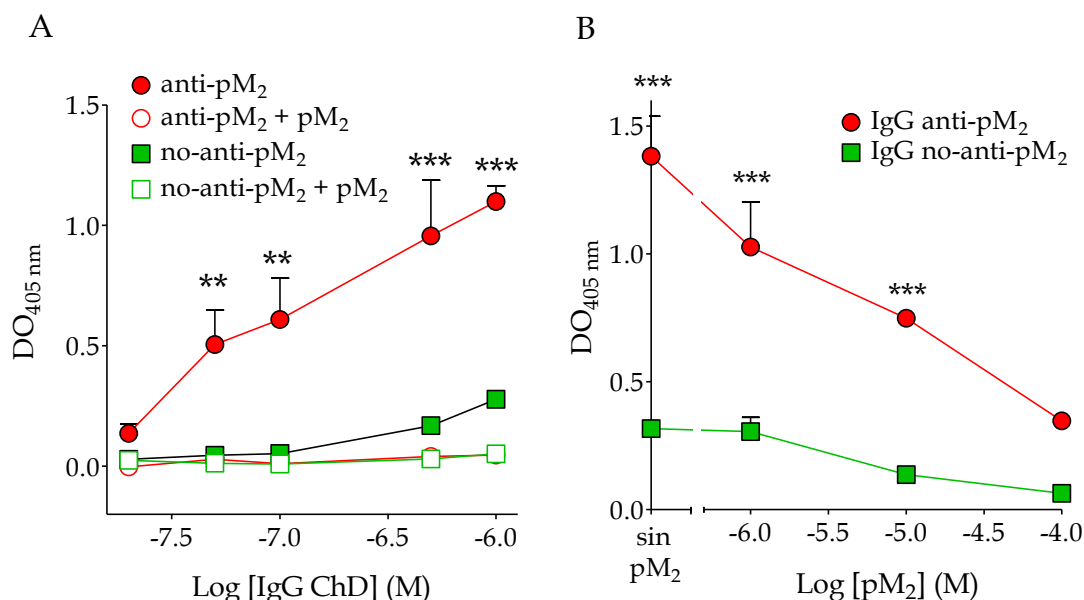


Figura 13. Monitoreo de la reactividad contra el II-LEC del RM₂ de la fracción IgG anti-pM₂ purificada por afinidad. (Panel A): Curva de concentración de Acs anti-pM₂ séricos en presencia o ausencia de pM₂ soluble. Placas de ELISA de 96 pocillos fueron cubiertas con 2,5 µg de pM₂ y posteriormente incubadas con concentraciones crecientes de IgG anti-pM₂ o no anti-pM₂ (0,02-1 µM) en presencia o ausencia de pM₂ soluble 100 µM. Los valores de DO representan los promedios ± ESM de 5 fracciones de IgG ChD realizados por triplicado. Diferencias significativas: ** p<0,01 y ***p<0,001: de IgG anti-pM₂ versus IgG anti-pM₂ + pM₂; IgG no anti-pM₂ o IgG no-anti-pM₂ + pM₂. (Panel B): Curva de inhibición de la reactividad anti-pM₂ por pM₂ soluble. El pM₂ inmovilizado en las placas del ensayo fue incubado con IgG anti-pM₂ o IgG no-anti-pM₂ (0,5 µM) preincubadas (o no) con pM₂ soluble en concentraciones variables (1, 10, o 100 µM) como se describió en Materiales y Métodos. ***p<0,001: diferencias significativas respecto de la misma concentración de IgG no anti-pM₂. Se indican valores promedio ± ESM de la fracción IgG anti-pM₂ de 3-5 pacientes chagásicos obtenidos en 3 experimentos independientes.

Por su parte, la fracción no anti-pM₂ exhibió una leve reactividad sólo a altas concentraciones, y su interacción con el péptido inmovilizado también resultó inhibida por el pM₂ soluble (Figura 13, A y B). Cabe aclarar que la reactividad contra el péptido inmovilizado de la fracción no anti-pM₂ (1 µM) fue comparable a la exhibida por IgG Control en la misma concentración (datos no mostrados).

Luego de evaluar la especificidad de las fracciones purificadas, se analizó el efecto de las mismas sobre la interacción RM₂/RM₂ en células HEK 293T expresando el par BRET RM₂-RLuc/RM₂-YFP.

En términos de inmunoreactividad contra el pM₂, ensayos de ELISA preliminares demostraron que una concentración de 1-2 µM de IgG ChD anti-pM₂ era equivalente a una concentración 50 µM de la fracción IgG sérica total en una muestra de 5 pacientes ChD con reactividad anti-pM₂ similar. Por este motivo investigamos los efectos de IgG anti-pM₂ purificada (2 µM) sola o suplementada con IgG Control o IgG no anti-pM₂ (actuando como inmunoglobulinas *carrier*), manteniendo una concentración final de IgG aproximada de 50 µM. Como control positivo, las células fueron incubadas con IgG ChD 50 µM.

En la Figura 14 puede apreciarse que la fracción monoespecífica anti-pM₂ (2 µM) sola no modifica significativamente la señal BRET, y que este efecto es comparable al exhibido por las fracciones IgG no anti-pM₂ o IgG Control. El agregado de la fracción IgG anti-pM₂, conjuntamente con IgG no anti-pM₂ o IgG Control, permitió recuperar el incremento de la señal BRET observado con la IgG ChD total, indicando que este efecto está inducido a través de la interacción de la fracción IgG ChD con especificidad por el II-LEC del RM₂ (Figura 14).

Estos resultados pudieron ser confirmados en el mismo sistema BRET, incubando las células con concentraciones variables de IgG anti-pM₂ en presencia de IgG no anti-pM₂ o IgG Control (50 µM) (Figura 15). En estas curvas la IgG anti-pM₂ alcanza efectos máximos de $16,2 \pm 2,1$ mB y $14,2 \pm 3,8$ mB en presencia de IgG no anti-pM₂ o IgG Control, respectivamente. Estos efectos máximos fueron comparables a los alcanzados por la IgG ChD total en concentración 50 µM ($13 \pm 1,3$ mB) ($p < 0,01$) (Figura 15). Considerando estas evidencias, concluimos que la fracción IgG monoespecífica contra el II-LEC del RM₂ es capaz de reproducir los efectos de la fracción IgG ChD total, lo cual sugiere que el incremento en la interacción entre los RM₂ inducido por la IgG ChD está mediado por el reconocimiento de este epítipo.

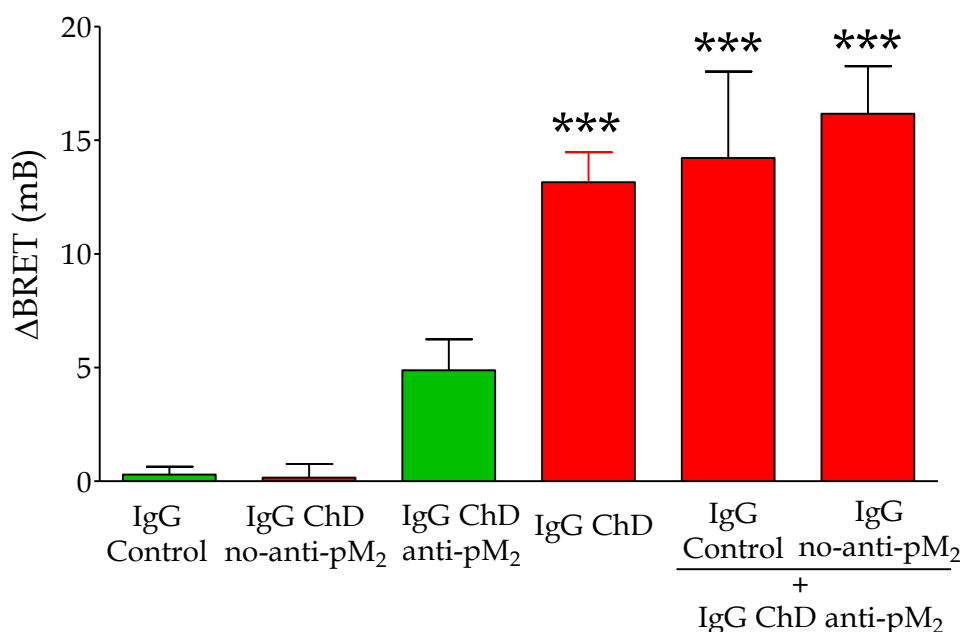


Figura 14. Modulación de la interacción RM₂/RM₂ por la fracción IgG ChD anti-RM₂ mono-específica. Células HEK 293T expresando el par BRET RM₂-RLuc/RM₂-YFP en relación equimolar fueron tratadas con IgG Control, IgG ChD, IgG ChD no anti-pM₂ (50 μM), o IgG ChD anti-pM₂ (2 μM) en ausencia o en presencia de IgG control o IgG no anti-pM₂ (48 μM) durante 60 min a TA. Las determinaciones de BRET se efectuaron 15 min después del agregado de celenteracina h (5 μM final). Los cambios netos en la relación BRET en presencia de inmunoglobulinas fueron expresados como “ΔBRET” (ver sección 4.5.3). Se indican valores promedio ± ESM de las fracciones IgG de 4-6 pacientes chagásicos con disautonomía o individuos controles obtenidos en al menos 3-5 experimentos independientes. (***): Diferencias significativas respecto de IgG Control, IgG anti-pM₂ o IgG ChD no anti-pM₂, con p<0,01.

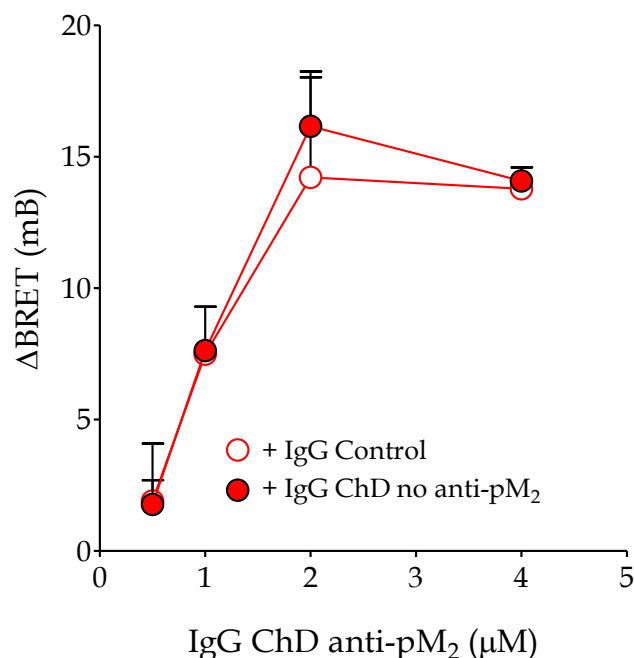


Figura 15. Modulación de la interacción RM₂/RM₂ por la fracción IgG ChD anti-RM₂ mono-específica. Curva concentración-respuesta. Células HEK 293T transfectadas de manera transitoria con el par BRET RM₂-RLuc/RM₂-YFP, en relación equimolar, fueron tratadas con diferentes concentraciones de IgG ChD anti-pM₂ (0,1-4,0 μM), en presencia de IgG Control o IgG ChD no anti-pM₂ (46-49,9 μM) durante 60 min a TA. Las determinaciones de BRET se efectuaron 15 min después del agregado de celenteracina h (5 μM final). Los cambios netos en la relación BRET en presencia de inmunoglobulinas fueron expresados como “ΔBRET” (ver sección 4.5.3). Se indican valores promedio ± ESM de la fracción IgG de 4-6 pacientes chagásicos obtenidos en al menos 3-5 experimentos independientes.

5.8. Modulación de la interacción RM₂/RM₂ en células vivas por Acs anti-RM₂: Participación del sitio alostérico común (EDGE) del II-LEC del RM₂.

Como se mencionó anteriormente, estudios previos demostraron que los Acs anti-RM₂ con actividad de agonista muscarínica presentes en el suero de pacientes chagásicos reconocen la secuencia de aminoácidos ácidos -EDGE (Glu¹⁷²- Asp¹⁷³- Gly¹⁷⁴-Glu¹⁷⁵)- del II-LEC del RM₂ [148, 149, 174, 175, 179]. Estos residuos corresponden a un sitio alostérico común del RM₂, y por ende es reconocido por diferentes moduladores alostéricos [184]. En consecuencia, decidimos investigar si un modulador alostérico negativo (galamina) era capaz de modificar el efecto de IgG ChD sobre la interacción RM₂/RM₂, al interferir en la unión de los Acs anti-RM₂ al sitio alostérico EDGE de su receptor blanco. En paralelo, evaluamos los efectos de un antagonista muscarínico (atropina) que sólo interacciona con el sitio ortostérico del RM₂.

Membranas obtenidas a partir de células expresando el par BRET RM₂-RLuc/RM₂-YFP fueron pre-incubadas con galamina 100 µM o atropina 10 µM durante 30 min y luego fueron incubadas con de IgG Control o IgG ChD (50 µM) durante 60 min a TA. Estos tratamientos se llevaron a cabo en presencia de un buffer de baja fuerza iónica (5mM Na/KPO₄, BSA 0,1%, pH 7,4), el cual favorece las interacciones de tipo alostérico [183, 199]. En estas condiciones, galamina -pero no atropina- inhibió el efecto estimulador de la IgG ChD sobre la señal BRET, mientras que ambos ligandos fueron incapaces de modificar los valores de BRET en membranas tratadas con buffer o IgG Control (Figura 16).

Estos resultados indican que los efectos de los anticuerpos anti-RM₂ sobre la interacción RM₂/RM₂ involucran el reconocimiento del sitio alostérico común EDGE a nivel del II-LEC del RM₂.

5.9. Modulación de la interacción RM₂/RM₂ inducida por IgG ChD. Rol de la bivalencia del anticuerpo

Una vez demostrada la capacidad de la fracción IgG ChD para modular la interacción RM₂/RM₂, así como la especificidad de este efecto a nivel de la molécula del receptor, decidimos profundizar sobre el mecanismo subyacente a este fenómeno a nivel de la molécula de inmunoglobulina. Por lo tanto, investigamos si el efecto modulador de los Acs

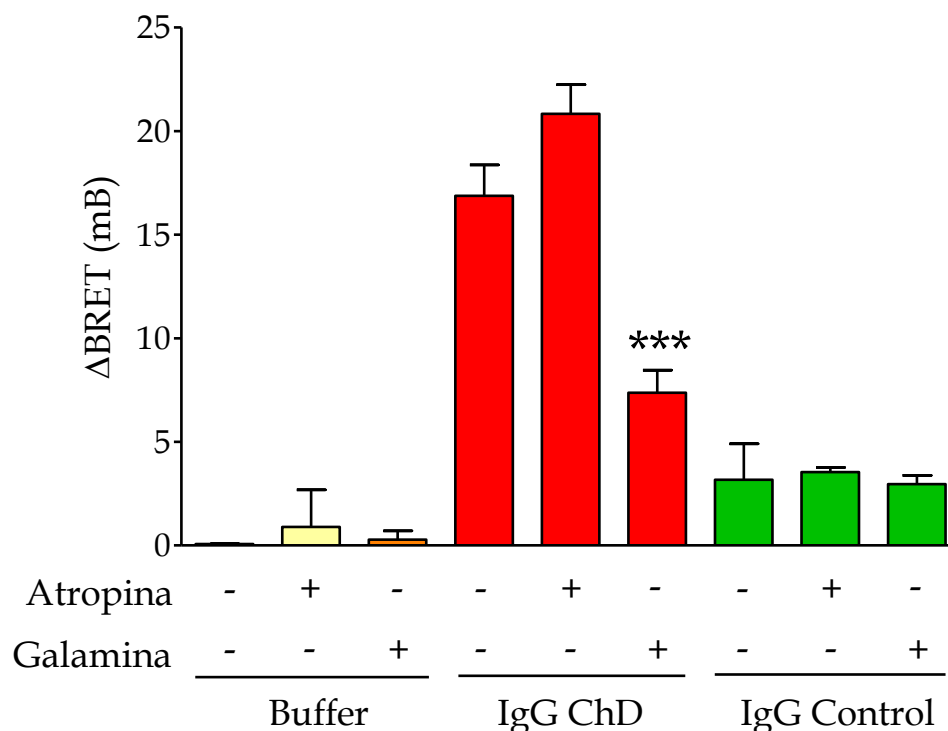


Figura 16. Efecto de IgG ChD sobre la interacción RM_2/RM_2 . Modulación por ligandos ortostéricos y alostéricos. Membranas crudas preparadas a partir de células HEK 293T expresando el par BRET RM_2 -RLuc/ RM_2 -YFP fueron resuspendidas en un buffer de baja fuerza iónica (buffer Na/KPO₄ suplementado con sero albúmina bovina 0,1%, pH 7.4) fueron pre-incubadas con galamina 100 μ M o atropina 10 μ M durante 30 min y luego fueron incubadas con IgG Control o IgG ChD 50 μ M durante 60 min de a TA. Las determinaciones de BRET se efectuaron 15 min después del agregado de celenteracina h (5 μ M final). Los cambios netos en la relación BRET en presencia de ligandos y/o inmunoglobulinas fueron expresados como “ Δ BRET” (ver sección 4.5.3). Los cambios netos en la relación BRET (Δ BRET) representan valores promedio \pm ESM de las fracciones IgG de 3 pacientes chagásicos con disautonomía o 3 individuos controles obtenidos en al menos 3 experimentos independientes. Diferencias significativas: (***) respecto de IgG Control sola o la IgG Control + atropina, con $p < 0,001$.

anti-RM₂ sobre la interacción RM₂/RM₂ ocurre a través del *crosslinking* de RM₂ por el anticuerpo bivalente.

Para probar esta hipótesis, se prepararon los fragmentos monovalentes Fab de IgG ChD o IgG Control por digestión papaínica. En cada caso, la fracción Fab fue separada de la fracción conteniendo los fragmentos Fc y la IgG no digerida mediante cromatografía de afinidad con proteína G-agarosa. La pureza de ambas fracciones fue analizada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). En la Figura 17A se muestra un gel representativo de la purificación del fragmento Fab a partir de la fracción IgG total de un paciente ChD o Control.

A continuación, realizamos enzimoimmunoensayos de inhibición para evaluar la reactividad anti-pM₂ de los fragmentos monovalentes Fab ChD. Para ello, se preincubó el pM₂ inmovilizado con Fab ChD en una primera etapa, y luego se realizó una segunda incubación con una dilución del suero de los pacientes en las mismas condiciones, antes de añadir el anticuerpo conjugado. Los valores de DO obtenidos en estas condiciones se compararon con los obtenidos al preincubar el pM₂ inmovilizado con Fab Control o PBS-BSA 1%. Como podemos observar en la Figura 17B, el Fab ChD inhibió en un 52,7% la interacción entre Acs anti-RM₂ del suero de los pacientes ChD y el péptido inmovilizado ($p < 0,001$) mientras que el Fab Control no alteró esta interacción. Estos resultados indican que los Fab ChD obtenidos por digestión papaínica conservan la reactividad contra el IIL-EC del RM₂ presente en la IgG sérica de partida, demostrando que el procedimiento de digestión y purificación de dichos fragmentos no alteró su sitio de reconocimiento al receptor.

Una vez monitoreada la pureza y la reactividad de la fracción Fab ChD mediante SDS-PAGE y ensayos de ELISA respectivamente, evaluamos su efecto sobre la interacción RM₂/RM₂. Para ello células expresando el par BRET RM₂-RLuc/RM₂-YFP fueron incubadas durante 1 h a TA con Fab ChD o Fab Control (50 μ M). En paralelo se realizaron experimentos controles incubando las células con IgG ChD o IgG Control. Estas IgG se utilizaron en concentración 25 μ M de modo de preservar la concentración molar total de sitios de combinación.

En contraste con la IgG ChD total, el fragmento Fab correspondiente fue incapaz de inducir un incremento significativo de la interacción RM₂/RM₂ en nuestro sistema BRET (Figura 18). Más aún, la señal BRET generada por el Fab ChD resultó similar a la obtenida

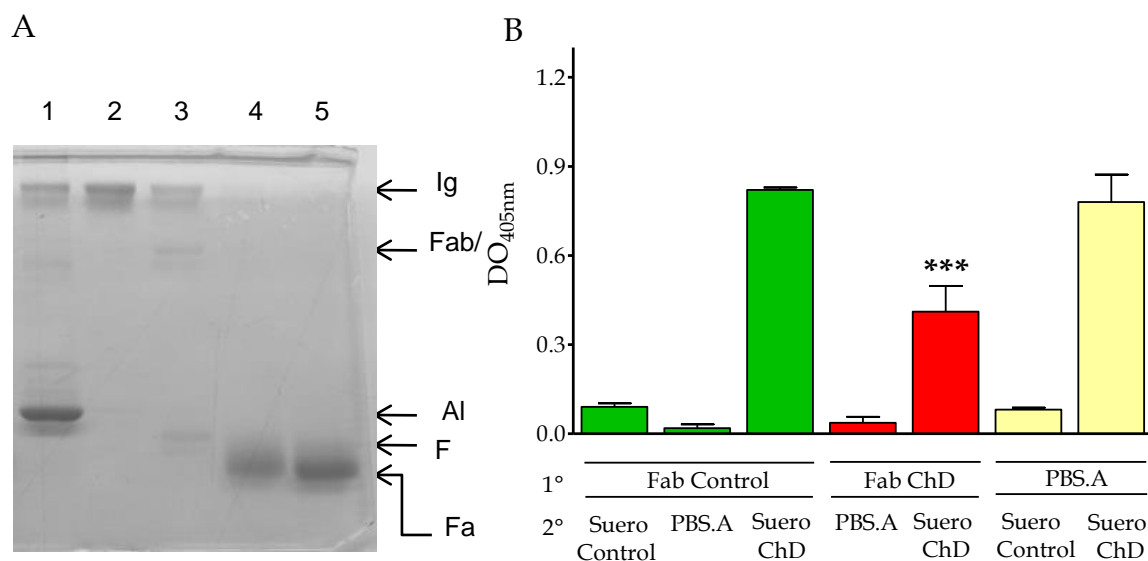


Figura 17. Monitoreo de la purificación del fragmento Fab de la fracción IgG sérica humana y control de su reactividad mediante ELISA. (*Panel A*): Fraccionamiento de las proteínas eluidas mediante SDS-PAGE: La fracción IgG sérica de un paciente chagásico fue purificada a partir del suero entero mediante cromatografía en DEAE celulosa. Con el propósito de obtener el fragmento Fab se realizó la digestión papaínica de la fracción IgG, y el digesto fue sometido a cromatografía de afinidad en agarosa-proteína G. El fragmento Fab fue eluido inicialmente con buffers PBS 1X, seguido de PBS 10X. Finalmente se eluyeron las fracciones IgG (sin digerir), Fc y Fab/c con buffer ácido (Glicina-HCl 0,1 M, pH 2,7). Las distintas fracciones proteicas obtenidas durante el proceso de purificación fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) (sección 4.10). Muestras sembradas: suero entero (muestra de partida) (calle 1), fracción IgG (calle 2), eluato del digesto papaínico con buffer ácido (calle 3), eluato con PBS 1X (calle 4) y eluato con PBS 10X (calle 5). (*Panel B*): Análisis de la reactividad anti-pM₂ del fragmento Fab ChD. El péptido pM₂ adsorbido en placas de ELISA fue incubado inicialmente (1°) durante 2 h a 37°C con Fab ChD, Fab Control (2,7 µM) o PBS.A 1%. En una segunda incubación (2°), se añadieron diluciones 1/50 de los sueros ChD o controles, o PBS.A 1% en las mismas condiciones. El revelado del enzoinmunoensayo se efectuó de acuerdo la sección 4.3.2. Se indican valores promedio ± ESM de la fracción Fab de 3 pacientes chagásicos y controles obtenidos en 2 experimentos independientes. (***) : Diferencias significativas respecto de todos los tratamientos, con $p < 0,001$.

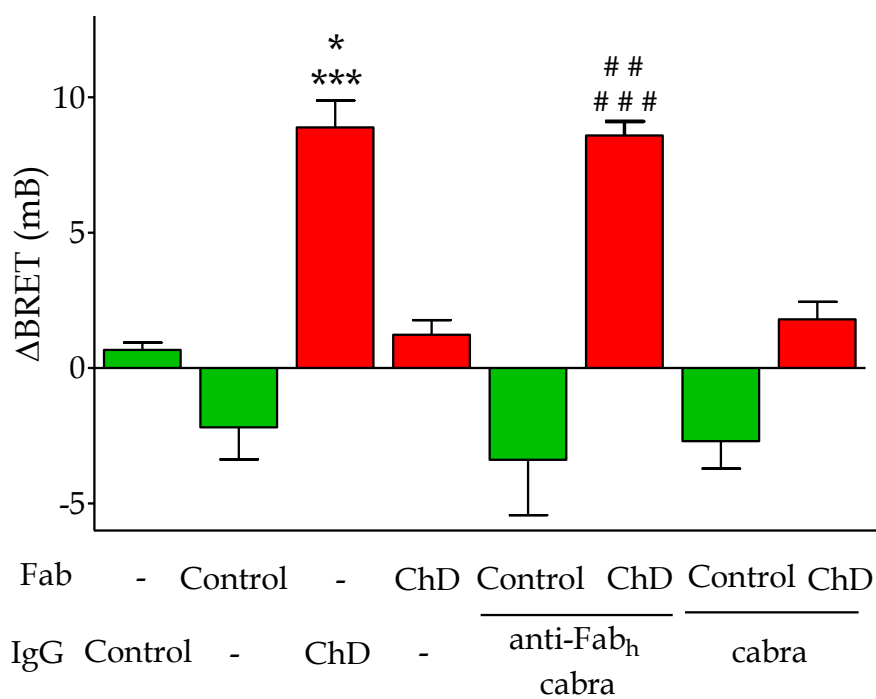


Figura 18. Efecto de los fragmentos monovalentes Fab ChD sobre la interacción RM₂/RM₂. Rol de la valencia del anticuerpo. Células HEK 293T expresando el par BRET RM₂-RLuc/RM₂-YFP fueron tratadas con los fragmentos monovalentes Fab Control o ChD (50 μM) en presencia o ausencia una IgG anti-Fab humano preparada en cabra (anti-Fab_h cabra) o IgG de cabra durante 60 min a TA. Paralelamente las células fueron tratadas con la fracción IgG Control o ChD total (25 μM). Las determinaciones de BRET se efectuaron 15 min después del agregado de celenteracina h (5 μM final). Los cambios netos en la relación BRET en presencia de inmunoglobulinas y/o fragmentos Fab fueron expresados como “ΔBRET” (ver sección 4.5.3). Las barras representan valores promedio ± ESM de la fracción Fab de 3-5 pacientes chagásicos con disautonomía o individuos controles obtenidos en al menos 3-5 experimentos independientes. Diferencias significativas: (*) respecto de IgG Control, Fab ChD o Fab ChD + IgG de cabra con p<0,05; (***) respecto Fab Control, de Fab Control + IgG anti-Fab_h cabra o Fab Control + IgG de cabra con p<0,001; (##) respecto Fab ChD + IgG de cabra con p<0,01; (###) respecto de Fab Control + IgG anti-Fab_h cabra o Fab Control + IgG de cabra con p<0,001.

con el Fab Control a la misma concentración. Sin embargo, el agregado de un anticuerpo (IgG) anti-Fab humano obtenido en cabra (IgG anti-Fab-h cabra) rescató la capacidad de la (IgG) anti-Fab humano obtenido en cabra (IgG anti-Fab-h cabra) rescató la capacidad de la IgG total para incrementar la interacción entre RM₂. Estos resultados sugieren que el incremento de la interacción RM₂/RM₂ inducido por la IgG ChD ocurre mediante *crosslinking* de receptores por anticuerpos bivalentes.

5.10. Relación entre la reactividad anti-pM₂ y el incremento de la interacción RM₂/RM₂ de fracción IgG del suero de los pacientes ChD

Los resultados previos indican que la fracción IgG sérica de pacientes ChD contienen Acs anti-RM₂ capaces de: a) reconocer el II-LEC del RM₂; b) modular positivamente la interacción RM₂/RM₂ a través de un mecanismo mediado por *crosslinking* de receptores. A continuación, se evaluó si estas propiedades físicoquímicas de los Acs anti-RM₂ correlacionaban con la presencia de disautonomía en los pacientes chagásicos estudiados. En función de este objetivo, se intentó dilucidar: 1) si existe una asociación entre la capacidad moduladora de la interacción RM₂/RM₂ por IgG ChD y la presencia de disautonomía en los pacientes chagásicos crónicos 2) si existe una correlación entre la reactividad anti-pM₂ sérica y la capacidad de la fracción IgG sérica correspondiente para modular la interacción receptor/receptor. Para dar respuesta a estos interrogantes se determinó: a) la reactividad anti-pM₂ sérica de los pacientes incluidos en los grupos 1 (ChD), 2 (ChND) y 3 (Control), mediante ELISA, b) la modulación de la interacción RM₂/RM₂ inducida por las IgG (50 µM) de los mismos pacientes, mediante BRET y c) la correlación entre ambos parámetros.

La distribución de los índices de reactividad anti-pM₂ sérica y los efectos moduladores de la interacción RM₂/RM₂ (Δ BRET) inducida por las fracciones IgG (50 µM) en los grupos estudiados se muestran en los escaterogramas representados en los paneles A y B de la Figura 19, respectivamente. Confirmando resultados previos [169, 175], la reactividad anti-pM₂ sérica de los pacientes ChD resultó significativamente mayor respecto de la reactividad sérica de los grupos ChND y Controles (Figura 19A). Los datos de índice de reactividad sérica fueron luego transformados en variables categóricas (serorreactividad positiva o negativa para anti-pM₂) y así permitieron demostrar la asociación entre seropositividad para Acs anti-RM₂ y disautonomía en los pacientes

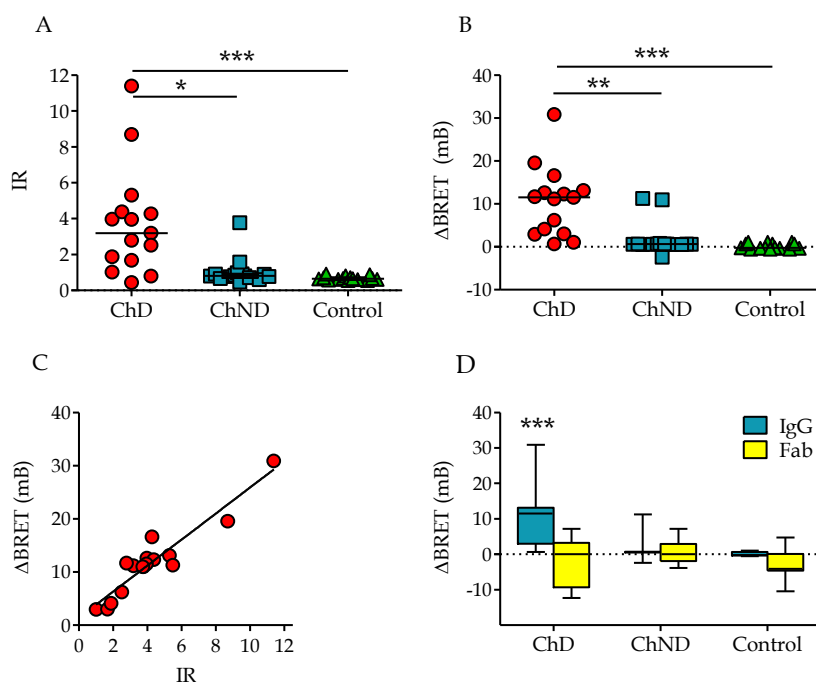


Figura 19. Anticuerpos circulantes de pacientes chagásicos con disautonomía. Correlación entre la reactividad anti-RM₂ y su capacidad moduladora de la interacción RM₂/RM₂. (Panel A): Escaterograma mostrando la inmunoreactividad contra el II-LEC del RM₂ de los Acs séricos de pacientes chagásicos crónicos con disautonomía (ChD, Grupo 1, n=15), chagásicos crónicos no disautonómicos (ChND, Grupo 2, n=15) e individuos no chagásicos, no disautonómicos (Control, Grupo 3, n=15), determinado por ELISA. Los resultados se expresan como el índice de reactividad (IR), donde IR = promedio de la DO_{405nm} de cada muestra sérica/valor de corte (VC). VC = promedio de DO_{405nm} de pacientes controles + 2DS. (Panel B): Escaterograma mostrando el incremento de la interacción RM₂/RM₂ promovido por los Acs circulantes de los pacientes de los Grupos 1, 2 y 3. Células HEK 293T coexpresando RM₂-RLuc y RM₂-YFP fueron incubadas con la fracción IgG total (50 μM) durante 30 min a TA. Las determinaciones de BRET se efectuaron 15 min después del agregado de celenteracina h (5 μM final). Los cambios netos en la relación BRET en presencia de inmunoglobulinas o fragmentos Fab fueron expresados como "ΔBRET" (ver sección 4.5.3). (Panel C): Correlación entre el IR de 16 pacientes seropositivos para Acs anti-RM₂ (Grupo 1: n=14; Grupo 2: n=2) y sus correspondientes incrementos en la interacción RM₂/RM₂ promovidos por las fracciones IgG séricas correspondientes (50 μM), analizadas mediante regresión lineal (Spearman $r^2 = 0.8756$, p < 0.0001). (Panel D): Efectos de las fracciones IgG séricas y sus correspondientes fragmentos Fab (50 μM) de pacientes de los Grupos 1, 2 y 3 sobre la interacción RM₂/RM₂ determinados por BRET. Los resultados se expresan como ΔBRET según se describió en los paneles B y C. En el gráfico de caja-bigote, las cajas indican los rangos intercuartiles y los bigotes representan los percentiles 5^{to} y 95^{to}. Paneles A, B y D: las líneas horizontales muestran las medianas. La comparación estadística entre los grupos se realizó mediante el test de Kruskal-Wallis seguido de un test de Dunn para comparaciones múltiples. (*) respecto del Grupo 2, con p < 0,05 y (***) respecto del Grupo 3, con p < 0,0001 (Panel A); (**) respecto del Grupo 2, con p < 0,001 y (***) respecto del Grupo 3, con p < 0,0001 (Panel B); (***) respecto de los Grupos 2 y 3, con p < 0,0001 (Panel D).

chagásicos estudiados (sección 5.1). En el escaterograma de la figura 19B se observa que las fracciones IgG séricas de los pacientes ChD fueron capaces de estimular la señal de BRET, en grado variable, con una mediana del incremento de BRET= 11,5 mB (IR= 10,1). En contraste, las fracciones IgG séricas de pacientes ChND y controles resultaron ineficaces, obteniéndose un BRET promedio de 0,6 mB (0,1) y -0,2 mB (1,0), respectivamente ($p < 0,0001$, respecto de IgG ChD). Estos datos sugieren que existe una asociación entre la capacidad moduladora de la interacción RM₂/RM₂ de los Acs séricos y la presencia de disautonomía en los pacientes chagásicos. Por otro lado, se observó una fuerte correlación positiva entre el índice de reactividad anti-pM₂ sérico y el efecto modulador de la interacción RM₂/RM₂ inducido por la fracción IgG sérica en los pacientes seropositivos para Acs anti-RM₂ (14 pacientes del Grupo 1 y 2 pacientes del Grupo 2) (r^2 de Spearman=0,88; $p < 0,0001$) (Figura 19C).

Para confirmar el rol de la bivalencia del anticuerpo en la modulación de la interacción RM₂/RM₂ inducida por los Acs anti-RM₂, comparamos la actividad de las fracciones IgG séricas y de sus correspondientes fragmentos Fab en los distintos grupos de pacientes. En el diagrama de cajas y bigotes que se muestra en la Figura 19D la fracción IgG sérica de los pacientes chagásicos disautonómicos fueron capaces de inducir un incremento en la señal BRET significativamente superior a los efectos de las fracciones IgG de los grupos 2 y 3. En contraste, los fragmentos Fab derivados de las correspondientes fracciones IgG no lograron alterar la señal BRET basal en ninguno de los 3 grupos estudiados. Estos datos confirman que la capacidad moduladora de la interacción RM₂/RM₂: a) está determinada por la reactividad de los Acs (IgG) que reconocen el II-LEC del RM₂; b) está asociada a la presencia de disautonomía secundaria a la infección chagásica; c) ocurre a través del *crosslinking* de receptores por anticuerpos bivalentes.

SEGUNDA PARTE: "Modulación de la señalización por Acs anti-RM2 de pacientes chagásicos con disautonomía"

Los hallazgos sobre la existencia de una fuerte asociación entre seropositividad para Acs anti-RM₂ y presencia de disautonomía en pacientes chagásicos crónicos [169, 175, 179], y la existencia de una fuerte correlación entre el título de Acs anti-RM₂ circulantes y el grado de inhibición de la actividad parasimpática cardiovascular en dichos pacientes [160] han sugerido que estos Acs participan en el mecanismo de la disautonomía chagá-

sica, particularmente a nivel de la rama parásimpática. En principio, el hecho que los niveles séricos de Acs anti-RM₂ correlacionen con el grado de inhibición de la función vagal sugiere que el efecto sostenido de estos anticuerpos afecta de algún modo la respuesta muscarínica a nivel del receptor efector. De acuerdo con este razonamiento, concebimos un escenario en el cual la exposición crónica de los RM₂ cardíacos a los Acs anti-RM₂ circulantes podría inhibir los efectos del agonista endógeno (acetilcolina) a través de estos receptores.

En la segunda parte de esta tesis investigamos si la interacción de los Acs anti-RM₂ de pacientes chagásicos con disautonomía con su receptor blanco es capaz de modular la señalización inducida por agonista, ya sea a nivel de la vía dependiente de proteínas G como aquella dependiente de arrestinas. Adicionalmente, evaluamos si estos efectos modulatorios son mediados por *crosslinking* de receptores.

5.11. Efecto modulador de la fracción IgG ChD sobre la señalización dependiente de proteína G_i, inducida por agonista. Caracterización del sistema bioluminiscente

En primer lugar, diseñamos un ensayo que permitiera monitorear la activación de la proteína G_i como consecuencia de la estimulación de RM₂ por agonista. En los últimos años, se ha desarrollado un ensayo luminométrico altamente sensible para caracterizar en tiempo real y en células vivas la señalización mediada por activación de los GPCR. El sistema involucra la coexpresión del receptor en estudio junto con la fotoproteína apoacuorina en células de mamífero. La activación de un GPCR capaz de acoplarse a proteína G_q, promueve la estimulación de la enzima fosfolipasa C (PLC), la generación del 2do mensajero inositol trifosfato y, subsecuentemente, un incremento en la concentración de calcio intracelular ([Ca²⁺]_i). El aumento de [Ca²⁺]_i puede ser detectado mediante luminometría utilizando la capacidad de la apoacuorina de emitir bioluminiscencia en presencia del cofactor cromóforo celenteracina h e iones Ca²⁺ [126].

Dado que el RM₂ está acoplado preferentemente a proteínas G_{i/o}, adaptamos esta metodología a nuestro sistema RM₂/G_i, utilizando la proteína quimera recombinante G_{α_{qi5}}. En esta proteína, los últimos 5 aminoácidos del extremo C terminal de la isoforma G_{α_q} están sustituidos por sus homólogos en la proteína G_{α_i}, de tal modo que la nueva proteína quimera G_{α_{qi5}} logra acoplarse al RM₂ con una afinidad comparable a G_{α_i}, pero señala como G_{α_q}. De esta manera construimos un sistema luminométrico en el cual cé-

lulas HEK 293T expresando RM₂, G_{q15} y apoacuorina, emiten luz, en presencia de celenteracina h e iones Ca²⁺, cuando son estimuladas por un agonista muscarínico.

Inicialmente se determinaron las condiciones experimentales óptimas para poder detectar los cambios en [Ca²⁺]_i con alta sensibilidad y especificidad. El ensayo estándar consistió en transfectar células HEK 293T con la mezcla de plásmidos RM₂:G_{q15}:apoacuorina en una relación de ADN plasmídico [1:1:4] mediante el método de lipofección. Luego de cargar las células con el cofactor celenteracina h (5 μM) durante 2,5 h a 22°C, las mismas fueron sembradas en placas de luminometría y tratadas con carbacol mediante inyección automatizada. Este tratamiento indujo un incremento rápido y transitorio de la señal luminiscente, por encima del valor basal, obteniéndose el valor pico (RLU_{Max A}) entre los 2 y los 6 seg posteriores a la inyección del agonista. Los valores basales se recuperaron entre los 25 y los 40 seg posteriores la inyección.

Como puede observarse en la Figura 20A, el agonista promovió un incremento de la señal luminiscente (RLU) en forma dependiente de su concentración, como consecuencia del incremento en la [Ca²⁺]_i. Los incrementos netos de la señal luminiscente, luego de la inyección del agonista, fueron normalizados en relación a la máxima respuesta de luminiscencia del sistema luego de la lisis celular, generando valores corregidos de “fracción de luminiscencia” (Lf) (ver Materiales y Métodos, sección 4.7.4). La Figura 20A muestra las variaciones de Lf en función de la concentración de agonista. Analizados mediante regresión no lineal, los datos obtenidos se ajustan a una típica curva sigmoidea con pendiente variable, caracterizada por un valor de CE₅₀=1,6 ± 0,08 μM (pCE₅₀: 5,67 ± 0,11; Pendiente de Hill: 0,50 ± 0,08) (Figura 20B). Por otro lado, el efecto de carbacol (10 μM) sobre la señal luminiscente fue inhibido por atropina, luego de preincubar las células durante 15 min con el antagonista en concentraciones variables, antes de inyectar el agonista. Nuevamente, el análisis de la curva obtenida se ajustó a una curva sigmoidea de inhibición con un valor de CI₅₀=0,4 ± 0.1 μM para el antagonista (Figura 20C). Estos datos confirman la especificidad muscarínica de la respuesta al agonista en nuestro sistema luminométrico. Estudios previos demostraron que el agonista carbacol puede inducir una activación moderada de la hidrólisis de fosfoinosítidos a través de la estimulación de RM₂, sugiriendo que el receptor activado es también capaz de acoplarse a la proteína G_q [70]. Si así fuera, la señal luminiscente detectada en nuestro sistema podría resultar, al menos en parte, como consecuencia de la activación de la vía G_q, por acoplamiento directo con el RM₂ estimulado por agonista. En consecuencia, se caracterizó la especificidad de proteína

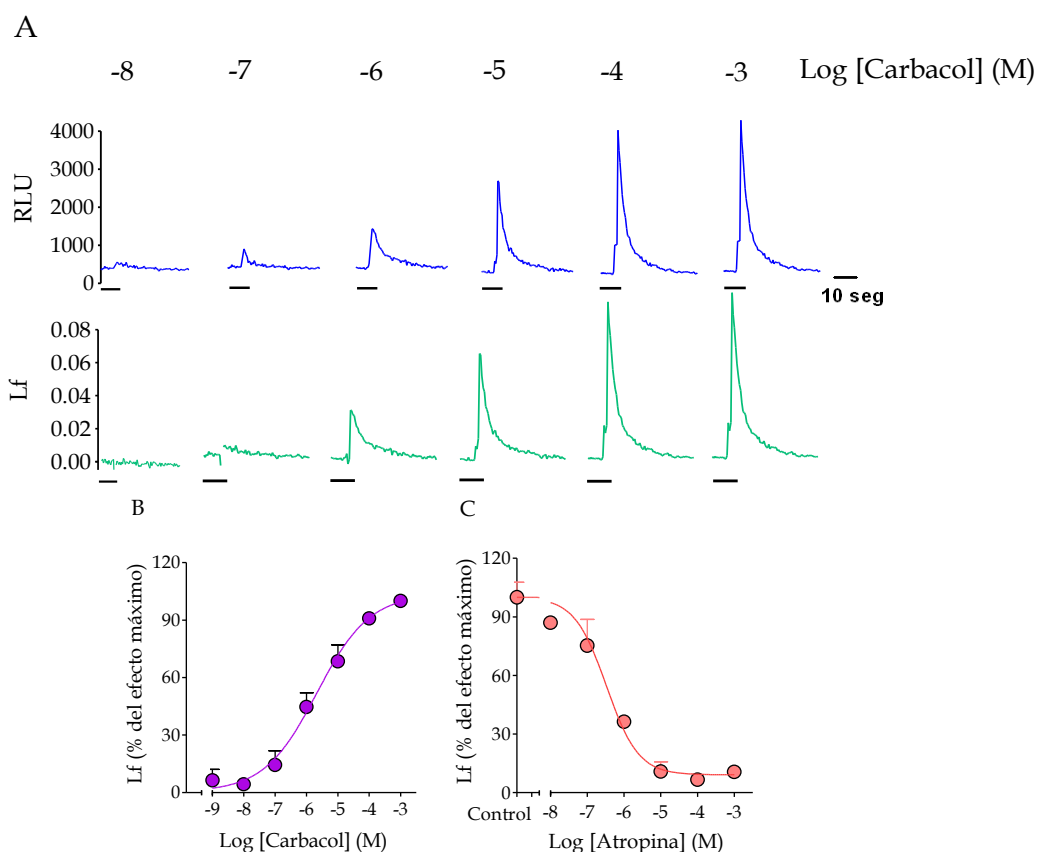


Figura 20. Caracterización del sistema RM_2/G_{q15} /acuorina para el monitoreo de la señalización dependiente de proteína G_i , mediada por RM_2 . Células HEK 293T sobreexpresando FLAG- RM_2 , $G_{\alpha_{q15}}$ y Apoacuorina fueron incubadas durante 2,5 h en presencia de celenteracina h a 22°C. Las variaciones en la concentración citosólica de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) en presencia de carbacol fueron determinadas mediante luminometría, inmediatamente después de la inyección del agonista (ver sección 4.7.3). (*Panel A*): Variaciones de la señal luminométrica en el tiempo, luego de tratar las células con carbacol en concentraciones crecientes. Los datos se expresan como unidades relativas de luminiscencia (RLU) (Registro superior), o en términos de “fracción de luminiscencias” (Lf), donde el valor de RLU máximo del pico correspondiente al inyectar el agonista fue normalizado respecto del valor RLU de la máxima luminiscencia posible luego de la lisis celular en presencia de 100 mM $CaCl_2$ (Registro inferior) (ver detalle en sección 4.7.4). (*Panel B*): Curva de concentración de agonista. Los valores pico de Lf del registro inferior fueron expresados como Lf porcentual respecto al obtenido con una concentración 10^{-2} M de agonista (efecto máximo=100%). (*Panel C*): Efecto de atropina sobre la estimulación de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por carbacol. Las células fueron preincubadas con concentraciones crecientes de atropina durante 15 min y la señal luminométrica fue determinada luego de la inyección de carbacol (10 μ M final). Los datos se expresan como Lf porcentual respecto al valor control, en ausencia de antagonista (100%). En todos los casos se indican valores promedios \pm SEM de 3 experimentos independientes, realizados por duplicado.

G en nuestro ensayo funcional. Para ello, se valoraron los efectos de diferentes concentraciones de carbacol sobre la señal luminiscente en células expresando RM₂, apoacuorina, con o sin sobreexpresión de G α_{q15} o G_q.

En la Figura 21 puede observarse que el agonista sólo es capaz de generar un incremento de la señal luminiscente en presencia de la proteína quimera G_{qi}, indicando que el efecto valorado por el sistema es consecuencia del acoplamiento del RM₂ activado a proteína G_i (en este caso G_{iq5}). En condiciones basales, sin sobreexpresión de proteínas G, el agonista es inefectivo, sugiriendo que la activación de la proteína G_i endógena no promueve estimulación de PLC, y por ende no se observa un incremento en [Ca²⁺]_i. Por otra parte, la proteína G_q endógena o sobreexpresada podría virtualmente activar PLC y generar una señal luminiscente, en virtud de los hallazgos mencionados anteriormente. Sin embargo, no se detectaron incrementos significativos de luminiscencia en estas condiciones, lo cual demuestra que, en este sistema celular, la activación de RM₂ no promueve acoplamiento eficiente de G_q. En conclusión, la señal luminiscente detectada en nuestro sistema acuorina monitorea únicamente la activación de la vía de señalización mediada por proteína G_i subsecuente a la activación de RM₂ por agonista, descartando la contribución de G_q.

5.12. Efecto de los Acs anti-RM₂ de pacientes chagásicos con disautonomía sobre la modulación de la señalización dependiente de proteína G estimulada por agonista.

A continuación, investigamos los efectos de los Acs anti-RM₂ de los pacientes chagásicos con disautonomía sobre la señalización -vía proteína G_i- acoplada a la activación de RM₂ por agonista, en nuestro sistema acuorina. Células coexpresando RM₂, G_{qi5}, y ApoAc fueron preincubadas durante 30 min a TA con IgG Control o IgG ChD en diferentes concentraciones. Posteriormente, se midió el incremento de [Ca²⁺]_i inducida por carbacol (10 μ M). En la Figura 22A se muestra un registro de luminiscencia representativo del incremento de [Ca²⁺]_i estimulado por carbacol en células preincubadas con IgG Control (Registro superior) o IgG ChD (Registro inferior). Los resultados de estos experimentos fueron expresados en términos de porcentaje del Lf control, obtenido en ausencia de IgG, de manera de ajustar las eventuales diferencias en la eficiencia de transfección entre los diferentes experimentos.

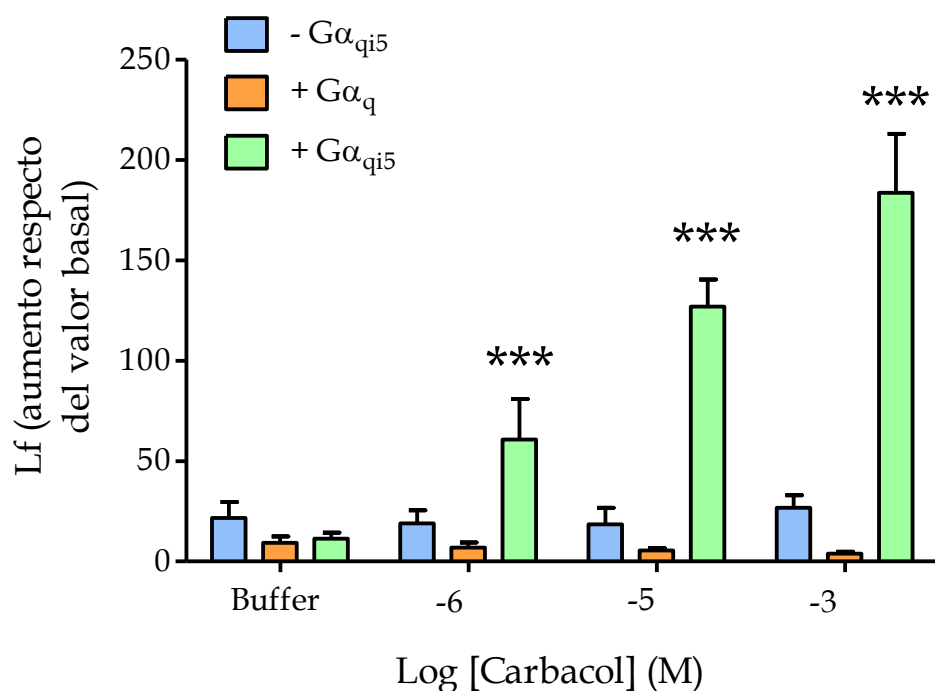


Figura 21. Especificidad de proteína G en la señalización mediada por RM_2 . Células HEK 293T expresando RM_2 y apoaequalina en presencia o ausencia de $G\alpha_{qi5}$ o $G\alpha_q$ fueron incubadas durante 2,5 h con celenteracina h a 22°C. Luego del tratamiento de las células con concentraciones variables de agonista, se determinó el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ mediante luminometría (ver sección 4.7.3), expresándolo en términos del aumento en el valor Lf respecto de la luminiscencia basal previa a la inyección de agonista o buffer (ver sección 4.7.4). Se muestran los valores promedios \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. Diferencias significativas: (***) respecto de células expresando el sistema RM_2 /apoaequalina en ausencia de $G\alpha_{qi5}$ o en presencia de $G\alpha_q$, con $p < 0,001$.

Observamos que la IgG ChD, a diferencia de la IgG Control, logró inhibir el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ estimulado por carbacol en forma dependiente de la concentración (Figura 22B). Si bien el valor promedio de la inhibición de la señal luminiscente fue de un 38% para IgG ChD 10 μ M, pudieron registrarse valores de inhibición superiores al 50 % con las fracciones IgG de algunos pacientes. Los valores de inhibición de la IgG ChD sobre la estimulación de la señalización mediada por carbacol fueron ajustados mediante regresión no lineal a una función sigmoidea de cuatro parámetros obteniéndose una IC_{50} de 1,4 μ M (pI_{50} : $5,86 \pm 0,28$; P. Hill: $-0,96 \pm 0,58$).

Por otro lado, se analizó el efecto de los fragmentos monovalentes Fab ChD y Control sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ estimulado por agonista. Como se puede apreciar en la Figura 22B, tanto el Fab ChD como el Fab Control fueron incapaces de reproducir el efecto inhibitorio de IgG ChD sobre el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por el carbacol, sugiriendo que la inhibición de la señalización dependiente de proteína G_i requiere del *crosslinking* de los receptores por los Acs IgG anti- RM_2 bivalentes.

5.13. Monitoreo de la interacción entre receptores muscarínicos M_2 y arrestina-2 en células vivas: Caracterización del sistema BRET utilizado.

Desde fines del siglo XX se conoce que el rol farmacológico del RM_2 activado por agonista no sólo se limita a la interacción preferencial del mismo con proteínas $G_{i/o}$, y a la subsecuente estimulación de cascadas de señalización dependientes de estas proteínas transductoras. La activación del RM_2 promueve, además, la fosforilación de residuos de serina y treonina a nivel de dominios intracelulares del receptor, catalizada GRKs, y la interacción con proteínas citosólicas adaptadoras especializadas (arrestinas). La interacción RM_2 /arrestina puede además desencadenar: a) el desacople de proteína G; b) el reclutamiento de proteínas involucradas en la endocitosis del receptor dependiente de arrestinas [84, 88, 202] c) la regulación de proteínas involucradas en el tráfico de receptores [203].

En base a estos antecedentes decidimos investigar los efectos moduladores de los Acs anti- RM_2 sobre el reclutamiento de arrestinas al RM_2 activado por agonista. Para ello, diseñamos un ensayo apto para el monitoreo de la interacción entre RM_2 y arrestina-2 (Arr-2) en presencia de agonista. Utilizamos un sistema BRET constituido por células HEK 293T intactas coexpresando transitoriamente las proteínas de fusión RM_2 -RLuc y

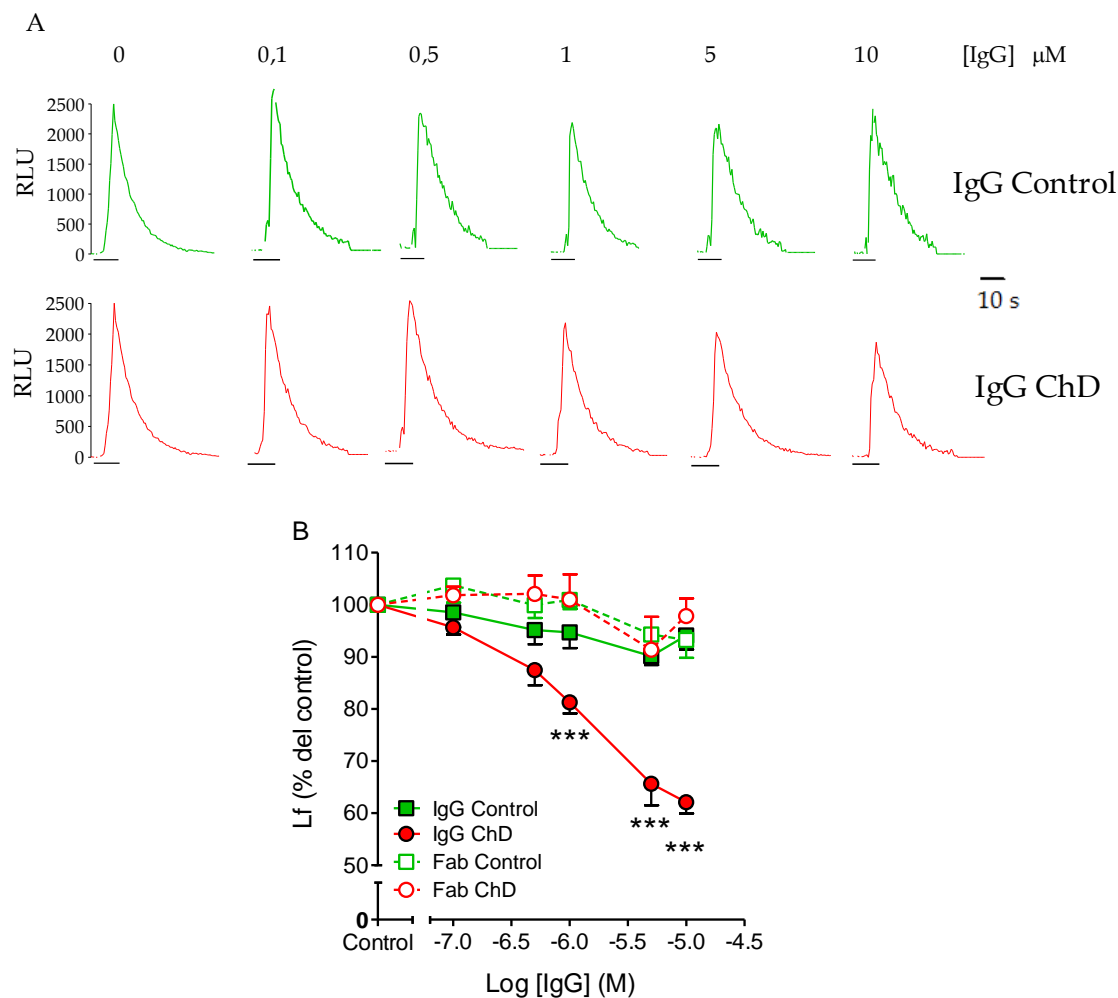


Figura 22. Efecto de IgG ChD y su fragmento Fab sobre la estimulación de la señalización via proteína G_i , mediada por RM_2 . Células HEK 293T expresando el sistema $RM_2/G\alpha_{q15}$ /acuorina fueron tratadas durante 2,5 h con celenteracina h a 22°C. Luego, las células fueron preincubadas durante 30 min a TA en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de IgG ChD o IgG Control. Finalmente, se midió el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ citosólica ($[Ca^{2+}]_i$) inducido por carbachol (10 μ M) mediante luminometría, de acuerdo a la sección 4.7.3. (*Panel A*): Experimento representativo de los efectos de IgG Control (registro superior) e IgG ChD (registro inferior) sobre el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ promovido por el agonista, a diferentes concentraciones de inmunoglobulinas, en función del tiempo. Los datos se expresan como valores Lf, según se detalla en la sección 4.7.4. (*Panel B*): Efecto comparativo de fracciones IgG/Fab ChD y Control sobre la señalización -via proteína G_i - mediada por RM_2 , estimulada por carbachol. Los datos obtenidos en los registros precedentes (Panel A) fueron expresados como Lf porcentual (Panel B) respecto al valor control, en ausencia de inmunoglobulinas o fragmentos Fab. Se indican los valores promedios \pm SEM de los registros de las fracciones IgG o fragmentos Fab de 3-4 pacientes chagásicos con disautonomía o individuos controles obtenidos en, al menos, 4-6 experimentos independientes realizados por duplicado. Diferencias significativas: (***) respecto de la misma concentración de IgG Control, Fab Control o Fab ChD, con $p < 0,001$.

señal BRET en presencia de celenteracina h. Debido a que trabajos previos indicaban que la unión de alta afinidad de Arr-2 al RM₂ requiere de la fosforilación del receptor [87], evaluamos los efectos de la sobreexpresión de GRK2, en paralelo.

En los primeros ensayos se realizaron curvas de titulación con el agonista carbacol para determinar una relación entre los niveles de expresión de RM₂-RLuc y los niveles de expresión de Arr-2-YFP que permitiera lograr la máxima sensibilidad en la detección de cambios en la transferencia de energía entre RLuc e YFP. Células HEK 293T expresando una cantidad fija de RM₂-RLuc y cantidades crecientes de Arr-2-YFP -en presencia o ausencia de sobreexpresión de GRK2- fueron tratadas con carbacol 10 μM durante 20 min. Los niveles de expresión del RM₂-RLuc y Arr-2-YFP fueron monitoreados mediante la determinación de la luminiscencia total y la fluorescencia total, respectivamente. En la Figura 23A, observamos que: a) El tratamiento con carbacol promueve el reclutamiento de Arr-2 al RM₂ en forma dependiente de la expresión relativa de Arr-2-YFP (respecto de RM₂-RLuc). b) Este efecto sólo pudo observarse en presencia de sobreexpresión de GRK2; c) No se detecta interacción constitutiva (en ausencia de agonista) entre RM₂ y Arr-2, ya sea en presencia o en ausencia de GRK2.

Para valorar los efectos netos del agonista sobre la interacción RM₂/Arr-2 se calculó la diferencia entre las señales BRET en presencia de carbacol y aquellas en presencia de buffer solo (Δ BRET). Luego se graficaron las curvas resultantes, tanto en presencia como en ausencia de GRK2 sobreexpresada (Figura 23B). Aquí observamos que el agonista estimula la interacción RM₂/Arr-2 únicamente en condiciones de sobreexpresión de GRK2, promoviendo un incremento gradual de la señal BRET hasta alcanzar valores máximos de saturación. El análisis estadístico de los datos obtenidos mediante regresión no lineal reveló una clásica isoterma de saturación en la cual la señal BRET es una función hiperbólica de la relación F/L, alcanzando una asíntota que corresponde a la saturación de todas las moléculas de la especie "-RLuc" por las de la especie "-YFP". Los parámetros característicos de esta curva fueron el Δ BRET máximo, (Δ BRET_{max} = 24,6 ± 4,6 mB), y el BRET₅₀ (BRET₅₀ = 0.15 ± 0.05). Cabe aclarar que los valores de Δ BRET_{max} y BRET₅₀ son análogos a los valores de B_{max} y K_d obtenidos habitualmente en los ensayos de saturación de unión de ligandos.

Para determinar el tiempo de incubación y la concentración de agonista óptimos para nuestro ensayo, llevamos cabo ensayos de BRET en células expresando RM₂-RLuc y Arr-2-YFP (en una relación F/L= 0.15-0.25) tratadas con carbacol 10 μM durante distintos

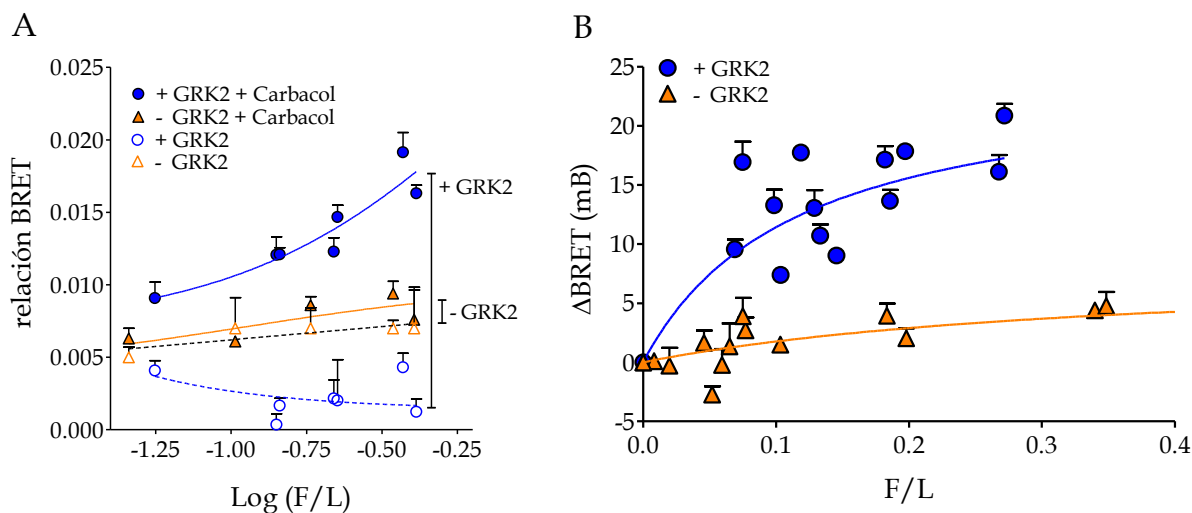


Figura 23. Caracterización del sistema BRET para el monitoreo de la interacción RM₂/Arr-2 en presencia de agonista. Participación de GRK2. Células HEK 293T expresando RM₂-RLuc y arrestina-2-YFP (Arr-2-YFP), con o sin sobreexpresión de GRK2, fueron resuspendidas en buffer KRHA e incubadas a 25°C en presencia y ausencia del agonista carbacol, según el procedimiento especificado en cada panel. Luego, se determinó fluorescencia total, luminiscencia total y la señal BRET, de acuerdo a las secciones 4.8.2 y 4.8.4. (*Panel A*): Variaciones en la relación BRET en función de los niveles de expresión de Arr-2-YFP normalizados de acuerdo a los niveles de expresión de RM₂-RLuc (Fluorescencia total/Luminiscencia total) (F/L). Las células fueron incubadas en presencia o ausencia de carbacol 10 μM durante 20 min. Los segmentos verticales indican los cambios netos máximos en la relación BRET, en presencia o ausencia de GRK2. (*Panel B*): Los valores graficados en el Panel A, donde las células fueron tratadas KRHA o carbacol (10 μM) durante 20 min, fueron expresados como “cambios netos de la relación BRET” (ΔBRET) promovidos por el agonista en función de los niveles relativos de expresión de Arr-2-YFP (F/L). Los datos fueron ajustados una hipérbola de un único sitio de unión. Los valores representan el promedio ± ESM de al menos 4-6 experimentos independientes realizados por triplicado.

tiempos o bien con distintas concentraciones del agonista durante 20 min. Los experimentos se llevaron a cabo en presencia y ausencia de sobreexpresión de GRK2 para confirmar el requerimiento de la sobreexpresión de la kinasa en el ensayo. En presencia de GRK2 sobreexpresada el agonista estimuló el reclutamiento de Arr-2 al RM₂ en forma dependiente del tiempo y la concentración, mientras que el incremento de la señal BRET no fue significativa en ausencia de kinasa sobreexpresada (Figura 24, A y B). El análisis de la cinética reveló que el máximo incremento de la señal BRET se alcanzó entre los 15 y 20 min de incubación con el agonista y se mantuvo estable durante al menos 10 min más. Los datos de esta curva fueron ajustados para una cinética de pseudo-primer orden, caracterizada por su constante de velocidad ($K = 0.32 \pm 0.04 \text{ min}^{-1}$), y su vida media ($t_{1/2} = 2,2 \pm 0,3 \text{ min}$) (Figura 24A). Los datos de la curva concentración-respuesta fueron ajustados mediante regresión no lineal a una función sigmoidea de pendiente variable, determinándose un $E_{\text{max}} = 30,1 \text{ mB}$ y una $CE_{50} = 3,91 \text{ } \mu\text{M}$ ($pEC_{50} \pm \text{ESM}: 5,41 \pm 0,13$; P. Hill: $0,50 \pm 0,08E$) (Figura 24B).

Como conclusión de la caracterización del ensayo de reclutamiento de Arr-2 al RM₂, las condiciones experimentales a utilizar en los experimentos subsiguientes para evaluar los efectos de los Acs anti-RM₂ en este sistema fueron: a) Expresión de RM₂-Rluc y Arr-2-YFP en una relación de F/L = 0.15-0.25 b) Coexpresión de GRK2; c) Tiempo de incubación con el agonista: 20 min; d) Concentración de agonista: 10 μM .

5.14. Reclutamiento de Arr-2 al RM₂ inducida por agonista. Efecto modulador de Acs anti-RM₂ de pacientes chagásicos con disautonomía

Utilizando el sistema BRET descrito en la sección anterior evaluamos la capacidad de los Acs anti-RM₂ para modular el reclutamiento de Arr-2 al RM₂ estimulado por agonista. Para ello, células expresando el par BRET RM₂-RLuc/Arr-2-YFP fueron preincubadas durante 30 min en presencia de IgG ChD, IgG Control o sus correspondientes fragmentos Fab en diferentes concentraciones (0,1-10 μM). Luego, las células fueron incubadas con carbacol 10 μM durante otros 30 min, y finalmente se determinó la señal BRET en presencia de celenteracina h. IgG ChD promovió una inhibición de la interacción RM₂/Arr-2 estimulada por el carbacol en forma dependiente de su concentración, mientras que IgG Control resultó inefectiva. La máxima inhibición del efecto del carbacol sobre la señal BRET fue de 78% y se logró con una concentración final de IgG ChD de 10

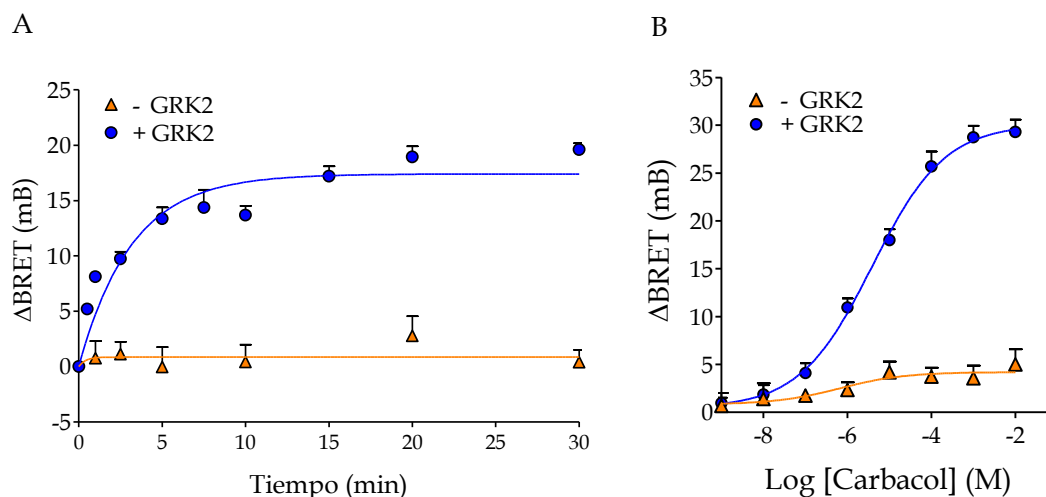


Figura 24. Caracterización del sistema BRET para el monitoreo de la interacción RM_2 /arrestina-2 en presencia de agonista. Curvas de tiempo y de concentración de agonista. Células HEK 293T expresando RM_2 -RLuc y Arrestina-2-YFP (Arr-2-YFP), con o sin sobreexpresión de GRK2, fueron resuspendidas en buffer KRHA e incubadas a 25°C en presencia y ausencia del agonista carbacol, según el procedimiento especificado en cada panel. Luego, se determinó fluorescencia total, luminiscencia total y la señal BRET, de acuerdo a las secciones 4.8.2 y 4.8.4. (*Panel A*): Las células expresando RM_2 -RLuc y Arr-2-YFP según una relación F/L= 0.15-0.20 fueron incubadas con carbacol 10 μ M durante diferentes tiempos. Los valores de la ordenada en ambos paneles fueron expresados como “cambios netos de la relación BRET promovidos por el agonista” (Δ BRET). Los datos se ajustaron a una cinética de pseudoprimer orden. (*Panel B*): Las células expresando el mismo sistema BRET utilizado en Panel A, fueron incubadas con diferentes concentraciones de carbacol durante 20 min. Los valores se ajustaron a un modelo sigmoideo de un único sitio. Los valores representan el promedio \pm ESM de al menos 4-6 experimentos independientes realizados por triplicado.

μM . El fragmento monovalente Fab ChD no logró reproducir el efecto de la IgG ChD, y sus efectos fueron comparables a los observados para Fab Control (Figura 25). Los valores de inhibición de la IgG ChD sobre la estimulación de la señalización mediada por carbacol se ajustaron una regresión no lineal (función sigmoidea) de cuatro parámetros obteniéndose una IC_{50} de $5,4\mu\text{M}$ (pI_{50} : $5,26 \pm 0,03$; P. Hill: $-3,56 \pm 0,98$).

Estos resultados indican que los Acs anti- RM_2 de los pacientes chagásicos con disautonomía modulan negativamente el reclutamiento de arrestina al RM_2 inducido por carbacol. Por otra parte, la incapacidad de Fab ChD para mimetizar los efectos de su IgG de partida sugiere que los efectos de esta fracción de Acs bivalentes estaría mediada por “crosslinking” de receptores.

5.15. Modulación de la señalización dependiente e independiente de proteínas G por Acs anti- RM_2 . Desensibilización/internalización del receptor o modulación alostérica?

Hasta aquí hemos reunido evidencias indicando que los Acs anti- RM_2 modulan negativamente la señalización mediada por proteína G_i y el reclutamiento de Arr-2 al RM_2 estimulados por el agonista farmacológico. De acuerdo a estos resultados y los datos de la bibliografía, consideramos dos escenarios posibles: a) Los Acs anti- RM_2 , en virtud de su actividad agonista, no sólo son capaces de activar al receptor, sino también de regularlo mediante mecanismos de desensibilización e internalización. En consecuencia, los efectos del agonista farmacológico mediados por RM_2 estarán disminuidos, dado que parte de los receptores se encuentran desensibilizados/internalizados por los Acs. b) Los Acs anti- RM_2 , en virtud de su capacidad para interactuar con el sitio alostérico común (EDGE) en el II-LEC del RM_2 , ejercen un efecto alostérico negativo sobre el receptor, promoviendo una inhibición de los efectos del agonista.

Con respecto a la primera hipótesis, consideramos la posibilidad de que los Acs anti- RM_2 promovieran la desensibilización e internalización de su receptor blanco en las condiciones utilizadas en nuestros sistemas. Es sabido que la estimulación del RM_2 por agonista promueve su fosforilación por GRKs y su interacción con arrestinas. Estos mecanismos inhiben la interacción del receptor con la proteína G, promoviendo la desensibilización de las respuestas asociadas. Consecuentemente, investigamos si los Acs anti- RM_2 eran capaces *per se* de promover el reclutamiento de arrestinas al RM_2 en presencia de GRKs. Con este propósito, células HEK-293 coexpresando RM_2 -RLuc y Arr-

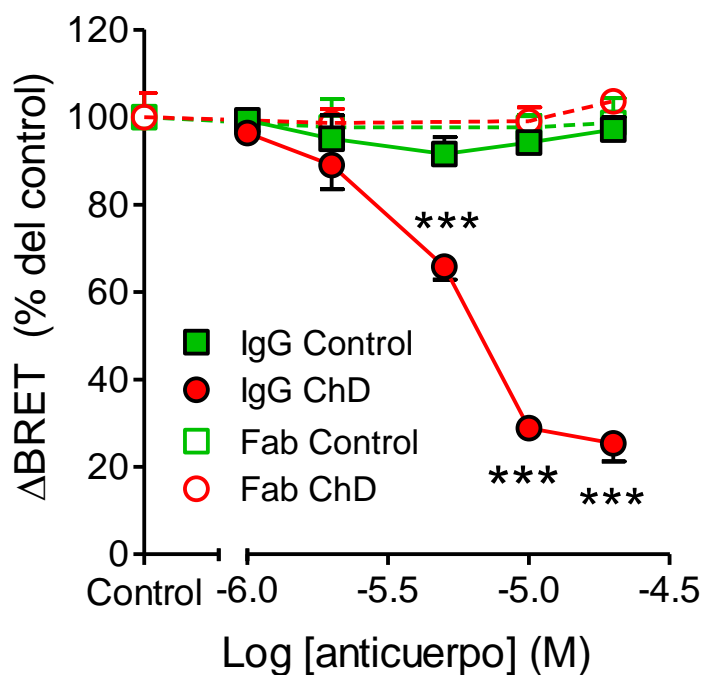


Figura 25. Efectos de IgG ChD y sus fragmentos Fab ChD sobre el reclutamiento de arrestina a RM₂ estimulado por agonista. Células HEK 293T expresando de manera transitoria RM₂-RLuc/arrestina-2-YFP según una relación F/L= 0.15-0.20 y GRK2 fueron preincubadas con diferentes concentraciones de IgG Control, IgG ChD, o sus fragmentos monovalentes Fab, durante 30 min a TA. Luego de estimular las células con carbacol 10 μ M durante 30 min a TA, se registró la señal BRET de acuerdo a la sección 4.8.4. Se indican valores porcentuales de Δ BRET respecto del valor control, correspondiente a las células preincubadas en ausencia de anticuerpos. Los valores representan los promedios \pm ESM de las fracciones IgG o sus fragmentos Fab de 3-4 pacientes chagásicos con disautonomía o individuos controles obtenidos en al menos 3-5 experimentos independientes, realizados por quintuplicado. Diferencias significativas: (***) respecto de igual concentración de IgG Control, Fab Control y Fab ChD, con $p < 0,001$.

2-YFP (en una relación F/L= 0,2) y GRK2 fueron tratadas con IgG ChD o IgG Control (10 μ M), durante 30 o 60 min y la señal BRET fue determinada por luminometría. Como puede observarse en la Figura 26, ninguna de estas fracciones logró estimular reclutamiento de Arr-2 a su receptor blanco en las condiciones del ensayo. Debido al rol clave de la interacción entre el RM₂ activado y arrestinas en el mecanismo de desensibilización de este receptor, estos datos sugieren que es improbable que los Acs en cuestión desensibilicen al receptor, en virtud de su incapacidad para reclutar arrestina.

A continuación, investigamos si los Acs anti-RM₂ pueden regular a corto plazo la expresión de su receptor blanco, promoviendo su internalización. Mientras existen cada vez más evidencias sugiriendo la participación de la unión de arrestina en la desensibilización del RM₂, la vía preferencial de internalización de este receptor en células HEK 293T, en ausencia de sobreexpresión de arrestina, probablemente sea independiente de arrestina [84]. Teniendo en cuenta estos datos, se puede sospechar que la atenuación de la señalización mediada por proteína Gi por los Acs anti-RM₂ (evaluado previamente en ausencia de sobreexpresión de arrestina) podría ocurrir como consecuencia de la internalización del receptor independiente de arrestina.

En primer lugar, se prepararon células HEK 293T expresando FLAG-RM₂ humanos en forma transitoria y se evaluó la aptitud del sistema para monitorear el secuestro de los receptores en presencia de agonista. Las células fueron tratadas a 37°C con diferentes concentraciones de carbacol durante 60 minutos, y posteriormente lavadas con buffer frío. Luego, se determinó el número de receptores superficiales mediante un ensayo de unión, utilizando el radioligando hidrofílico N-metilescopolamina ([³H]-NMS), en concentración saturante. La densidad de receptores superficiales fue de 200-284 fmol/mg de proteína celular. El agonista indujo el secuestro del RM₂ en forma dependiente de su concentración obteniéndose un valor de CI₅₀= 0,4 μ M (pIC₅₀ \pm SEM: 6,5 \pm 0,16) y alcanzando un 54 \pm 3 % de inhibición con las concentraciones máximas de agonista (Figura 27A).

Seguidamente, se investigó la capacidad de los Acs anti-RM₂ para inducir secuestro de receptores en el sistema celular previamente caracterizado. Las células expresando FLAG-RM₂ fueron preincubadas durante 60 min con IgG ChD en concentraciones variables, o bien con IgG Control 25 μ M. Luego, las células fueron lavadas en frío y tratadas con [³H]-NMS a 4 °C durante 4 h. Tanto la fracción IgG ChD como la fracción IgG Control fueron incapaces de promover internalización RM₂ en todas las concentraciones ensayadas (Figura 27B).

Yamanushi y col, demostraron que la fosforilación del receptor y el reclutamiento de arrestina puede jugar un rol importante en la desensibilización e internalización del RM₂ en el corazón [90]. Al comparar la lenta desensibilización del canal rectificador de K sensible a Ach ($I_{K,ACh}$), una importante corriente iónica reguladora en el corazón, y la internalización del RM₂ en células de aurícula de rata sobreexpresando GRK2 y Arr-3, estos autores encontraron similitudes en la cinética de ambos procesos, sugiriendo que la lenta desensibilización de la $I_{K,ACh}$ en el corazón podría ser el resultado de la internalización del RM₂.

Basándonos en estas observaciones, se investigó si la sobreexpresión de GRK2 y arrestina no visuales podían facilitar la internalización del receptor por los Acs anti-RM₂. Cuando células HEK 293T transfectadas transitoriamente con FLAG-RM₂, GRK2 y Arr-2-YFP (o Arr-3-FLAG) eran pretratadas con carbacol 1 mM, se observó un aumento en la proporción de receptores internalizados ($74 \pm 4\%$ y $81 \pm 2\%$, respectivamente) (Figuras 27C y 27D), en comparación con las células expresando sólo FLAG-RM₂ y pretratadas con la misma concentración de agonista ($54 \pm 1\%$), con $p < 0,001$ (Figura 27A), lo cual confirma el efecto sinérgico de GRK2 y arrestina en la internalización del RM₂ [89]. En contraste, la IgG ChD o IgG Control no promovieron internalización del RM₂, indicando que los Acs anti-RM₂ no son capaces de estimular la internalización del RM₂ en células HEK 293T sobreexpresando GRK2 y arrestinas no visuales.

En conjunto, no encontramos evidencias sugiriendo que los Acs anti-RM₂ promuevan regulación de su receptor blanco a corto plazo (desensibilización/internalización), al menos en el sistema (HEK 293T) y en las condiciones experimentales utilizadas. Por lo tanto, la hipótesis según la cual estos Acs ejercerían un efecto alostérico negativo sobre el RM₂, inhibiendo los efectos del agonista farmacológico, es la que más se ajusta a las evidencias experimentales obtenidas. Este trabajo no descarta que en otros sistemas biológicos *in vitro* o *in vivo* los Acs anti-RM₂ de la fracción IgG ChD regulen a su receptor blanco en virtud de su capacidad agonista. Sin embargo, de acuerdo a los presentes resultados proponemos que, independientemente de la potencial capacidad regulatoria de estos anticuerpos, estos anticuerpos actúan como moduladores alostéricos negativos del RM₂, inhibiendo la señalización estimulada por el agonista farmacológico.

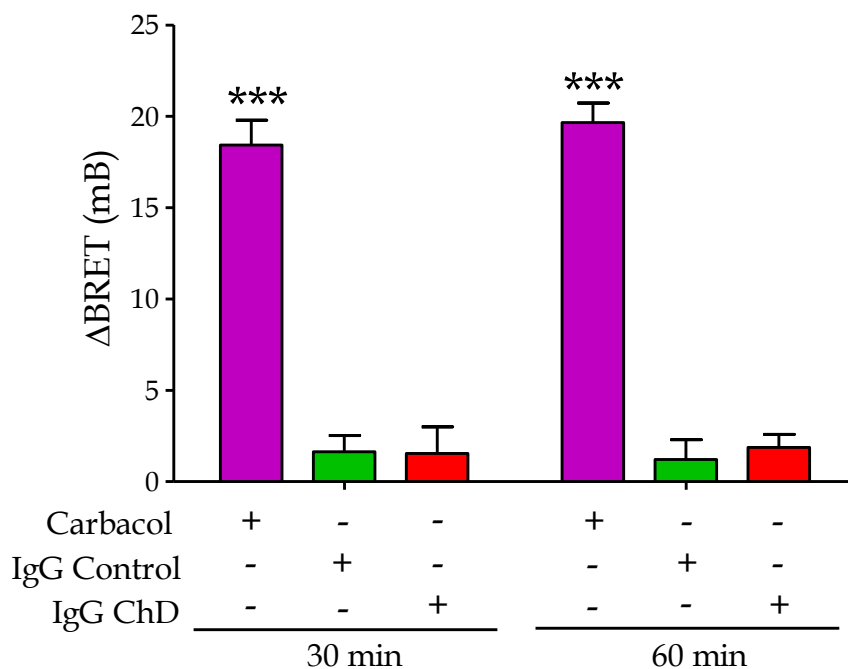


Figura 26. Efecto de IgG ChD sobre la interacción RM₂/arrestina-2 en células vivas. Células HEK 293T expresando de manera transitoria el par BRET RM₂-RLuc/ Arr-2-YFP y GRK2 fueron tratadas con carbacol, IgG Control o IgG ChD (10 μM) durante 30 o 60 min a TA. Las determinaciones de la señal BRET y los cálculos de ΔBRET (cambios netos en la relación BRET promovidos por carbacol o inmunoglobulinas) se detallan en la sección 4.8.4. Los valores de ΔBRET representan los promedios ± ESM de las fracciones IgG de 5-7 pacientes chagásicos con disautonomía o individuos controles, o bien de 7 experimentos con carbacol, realizados por quintuplicado. Diferencias significativas: (***) respecto de IgG ChD o Control, con p<0,001.

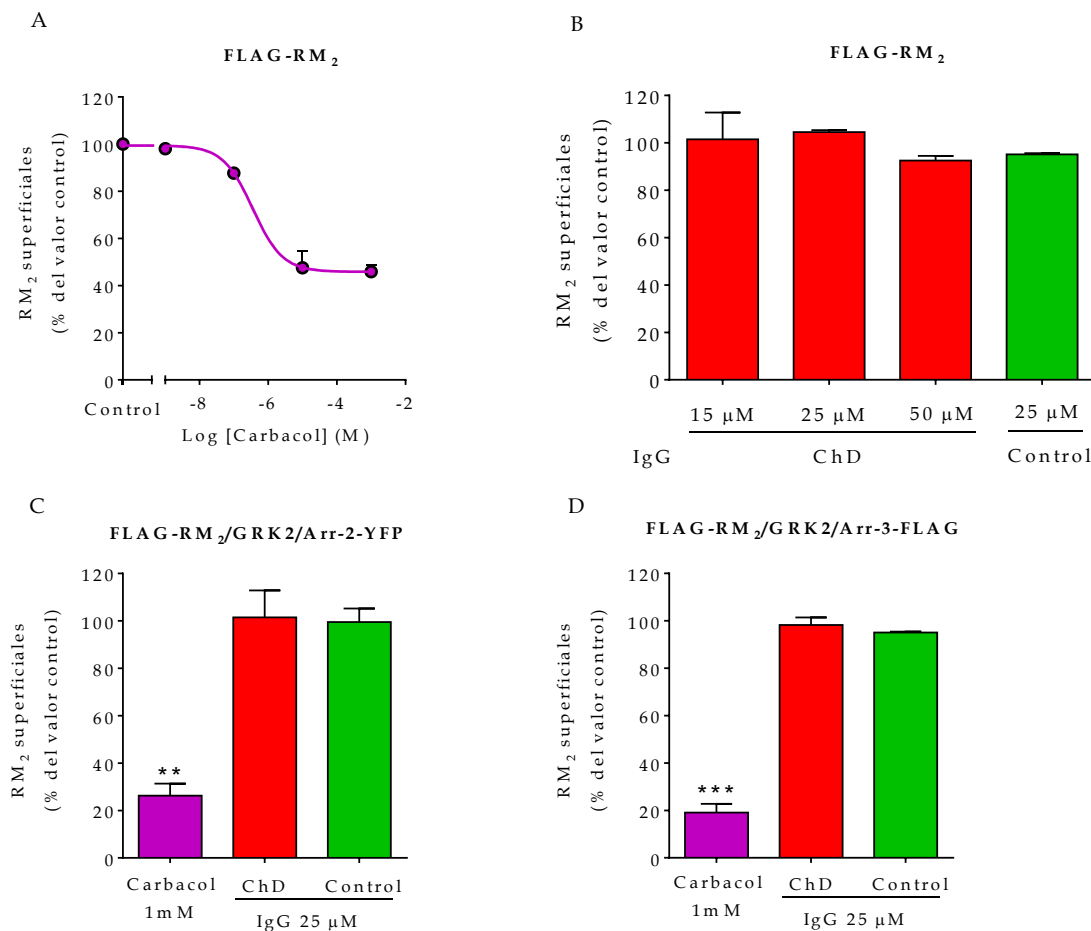


Figura 27. Efecto de IgG ChD sobre la internalización de RM₂. Células HEK 293T expresando el FLAG-RM₂ solo (*Panel A y B*) o conjuntamente con GRK2 y una arrestina no visual modificada [Arr-2-YFP (*Panel C*) o Arr-3-FLAG (*Panel D*)] fueron preincubadas con diferentes concentraciones de carbacol (*Panel A*) o con las fracciones IgG (ChD o control), en las concentraciones indicadas, durante 60 min a 37°C (*Panel B-D*). Posteriormente las células fueron lavadas, cosechadas y la densidad de receptores superficiales fue determinada mediante ensayos de saturación, utilizando el ligando muscarínico hidrofílico N-metilescopolamina [³H]NMS (1 nM), como se describió en la sección 4.9. La densidad de receptores superficiales en las células no tratadas fue de 200-284 fmol/mg de proteína celular. Se indican valores promedios ± SEM de las fracciones IgG de 3-5 pacientes ChD o Control, o bien con carbacol, en 2-4 experimentos independientes realizados por triplicado. Diferencias significativas: (**) y (***) respecto de las células preincubadas con IgG ChD o IgG Control, con (**) p<0,01 y (***) p<0,0001.

6. DISCUSIÓN

La presencia de lesiones histopatológicas en la innervación autonómica intrínseca del corazón y de alteraciones funcionales del SNA en la enfermedad de Chagas crónica han sido ampliamente documentadas. En particular, la existencia de una modulación parasimpática alterada de la fisiología cardiovascular (disautonomía o disfunción autonómica) en los pacientes chagásicos ha sido descrita por numerosos autores desde el descubrimiento de la enfermedad [116, 132, 136, 155, 162]. Debido a que no existen evidencias concluyentes sobre una asociación entre la presencia de disautonomía cardiovascular y el desarrollo de miocardiopatía en la infección chagásica, el significado fisiopatológico de la disautonomía chagásica sigue siendo objeto de controversia. En otras enfermedades, como insuficiencia cardíaca, diabetes mellitus e infarto de miocardio, la presencia de disautonomía parasimpática ha sido asociada con un incremento de la mortalidad y morbilidad [204]. Estos hallazgos, junto con el hecho de que la disfunción autonómica ocurre tempranamente en el curso de la infección por *T. cruzi*, sugieren que la disautonomía podría tener un rol fisiopatológico en el desarrollo de arritmias y muerte súbita en los pacientes chagásicos crónicos [136, 204].

Al comenzar este proyecto se conocía que: a) los Acs anti-RM₂ circulantes están fuertemente asociados con la disautonomía en pacientes chagásicos crónicos [169, 175, 179] y que sus niveles séricos correlacionan positivamente con el grado de disfunción vagal [160]; b) estos anticuerpos se unen al RM₂ y poseen actividad muscarínica, demostrada en base a su capacidad para estimular *per se* al RM₂, inhibir efectos biológicos de agonistas muscarínicos y regular al RM₂ a corto plazo; c) la mayor parte de los GPCR, entre ellos los RM₂, están involucrados en interacciones receptor-receptor, las cuales pueden cumplir un rol relevante en la funcionalidad de los mismos.

En este contexto, decidimos investigar si la exposición crónica de los RM₂ a los Acs séricos anti-RM₂ de pacientes chagásicos crónicos con disautonomía puede provocar cambios en la estructura su receptor blanco que afecten la señalización gatillada por el agonista farmacológico, tanto dependiente de proteína G como dependiente de arrestina. Adicionalmente, investigamos el rol del *crosslinking* de receptores en estos efectos moduladores.

6.1. Caracterización clínica e inmunológica de los pacientes estudiados

Al evaluar la reactividad sérica de los anticuerpos contra el II LEC del RM₂ mediante ELISA, se observó una mayor prevalencia de Acs anti-RM₂ en pacientes chagásicos crónicos con disautonomía cardiovascular (ChD, Grupo 1) en comparación con los pacientes chagásicos crónicos no disautonómicos (ChND, Grupo 2) y los pacientes control (Control, Grupo 3) (Tabla 2 y Figura 19A). Estos resultados son coherentes con datos comunicados previamente, y confirman la existencia de una fuerte asociación entre la presencia de Acs anti-RM₂ y disautonomía cardiovascular en pacientes chagásicos crónicos [169, 175, 179]. A pesar de que en éste y en otros trabajos la mayoría de los pacientes ChD son seropositivos para Acs anti-RM₂, fue posible detectar un bajo porcentaje de pacientes seronegativos; esto podría deberse tanto a una limitada sensibilidad del inmunoensayo para detectar los anticuerpos o a la limitada especificidad de algunos de las pruebas para evaluar disautonomía [175, 179]. La presencia de dos pacientes seropositivos en el grupo de los ChND podría ser explicada por la limitada sensibilidad de las pruebas para evaluar disautonomía [179]. Por otra parte, estudios previos han sugerido que los signos de disautonomía en los pacientes chagásicos seropositivos para Acs anti-RM₂ podrían eventualmente aparecer en estadios más avanzados de la enfermedad, lo cual sugiere un rol patogénico de los Acs anti-RM₂ en el desarrollo del síndrome disautonómico [205].

6.2. Modulación de la interacción RM₂/RM₂ por Acs anti-RM₂ de pacientes chagásicos disautonómicos

Dado que la señal BRET es la consecuencia de la interacción entre una proteína dadora de energía (RLuc) y otra aceptora de energía (YFP), y que RLuc e YFP no interactúan entre sí cuando no se expresan como proteínas de fusión, una señal BRET basal apreciable entre RM₂-RLuc y RM₂-YFP ha sido previamente interpretada como una interacción constitutiva entre dos moléculas de RM₂ formando homo- o heterooligómeros [100].

En el presente trabajo, se observó que la fracción IgG ChD es capaz de incrementar la señal BRET entre RM₂-RLuc y RM₂-YFP expresadas en células intactas por encima del valor basal, en forma dependiente del tiempo y la concentración de IgG. Este incremento en la transferencia de energía indica que los anticuerpos provocan, en principio, un aumento en la proximidad física entre RLuc e YFP o bien en la orientación relativa de las mismas [206] (Figura 8). Dado que RLuc e YFP están unidas a sendas moléculas de RM₂,

concluimos que los Acs anti-RM₂ interaccionan con RM₂ adyacentes, modulando positivamente la interacción receptor/receptor.

En primer lugar, el efecto observado demostró ser específico de la molécula de inmunoglobulina ensayada, ya que la fracción IgG obtenida de pacientes controles (IgG Control) no modificó la interacción entre los receptores RM₂. Estos resultados son concordantes con nuestros trabajos previos donde se demostró que la IgG Control no reconoce a los RM₂ [170, 175, 178].

En segundo lugar, el incremento de BRET fue específico de la molécula de receptor: la IgG ChD fue incapaz de estimular la transferencia de energía entre proteínas de fusión derivadas de un RM diferente de RM₂ (Figura 10). El hecho de que las interacciones constitutivas RM₃-RLuc/RM₃-YFP no fueran modificadas por IgG ChD no resultó inesperado, ya que: a) ninguno de los pacientes chagásicos involucrados en este estudio mostró seroreactividad contra un péptido representativo del II LEC del RM₃ (pM₃) en comparación con pacientes controles (datos no mostrados); b) trabajos anteriores demuestran que los pacientes chagásicos crónicos no son inmunorreactivos para pM₃ [149]. Adicionalmente, la exposición de células coexpresando RM₂-RLuc y RM₃-YFP (o su combinación inversa) a los anticuerpos de la fracción IgG ChD tampoco generó un incremento de BRET. Estos resultados sugieren que, incluso si la IgG ChD facilitara la interacción entre dos moléculas de RM₂ involucradas en heterooligómeros (RM₂/RM₃) preformados, tal acercamiento no favorece la modulación de la interacción receptor/receptor entre RM₂ y RM₃. En conclusión, el incremento en la señal BRET promovido por IgG ChD modula específicamente la interacción entre dos moléculas de RM₂.

El incremento de la señal BRET inducida por IgG ChD sobre el sistema RM₂-RLuc/RM₂-YFP no fue generada simplemente debido a su capacidad unirse al RM₂. Tanto los ligandos muscarínicos ortostéricos (carbacol, pilocarpina y atropina) como alostéricos (galamina) fueron incapaces de mimetizar los efectos de los Acs anti-RM₂ en el sistema BRET utilizado (Figuras 11). Podría argumentarse que estos anticuerpos interaccionan con el RM₂, generando un estado de activación particular en el receptor, diferente del inducido por los agonistas muscarínicos convencionales, el cual podría favorecer la interacción entre dominios transmembrana de receptores adyacentes. Sin embargo, la preincubación de las células con atropina (capaz de bloquear la activación de RM₂ por IgG ChD [169, 170, 174, 175, 178, 179]) no logro impedir el aumento de la señal BRET, sugiriendo que este efecto no ocurre como consecuencia de la activación del receptor.

Debido a que la fracción IgG ChD puede regular la expresión y la función de RM₂ induciendo desacople de la proteína G y secuestro de RM₂ en células CHO [171], podría suceder que el incremento de BRET promovido por IgG ChD sea una consecuencia de la concentración de receptores en vesículas endocíticas (“clustering”) como consecuencia de la endocitosis del receptor. En primer lugar, el pretratamiento de las células con atropina (capaz de inhibir completamente la endocitosis del receptor mediada por agonista) no modificó el efecto de los Acs anti-RM₂ sobre la señal BRET (Figuras 12). En segundo lugar, IgG ChD también logró modular positivamente la interacción RM₂/RM₂ en preparaciones de membranas obtenidas a partir de células que coexpresaban RM₂-RLuc y RM₂-YFP, lo cual indica que este efecto modulador ocurre a nivel de la membrana plasmática (Figuras 9). En tercer lugar, en este trabajo se demostró que IgG ChD no promueve el secuestro de RM₂ en células HEK 293T (Figura 27B). De acuerdo a estas evidencias, la hipótesis según la cual el efecto de IgG ChD sobre la señal BRET es una consecuencia de la endocitosis del receptor resulta improbable.

En este estudio, se analizaron dos propiedades esenciales que distinguen a los anticuerpos contra GPCR con actividad intrínseca de los agonistas farmacológicos convencionales: el sitio de unión en la molécula del receptor y la valencia del ligando. Mientras los agonistas muscarínicos convencionales son monovalentes e interaccionan con aminoácidos de los DTM III, V, VI y VII [207], los anticuerpos con actividad muscarínica son moléculas bivalentes que reconocen dominios extracelulares del receptor, en particular, el II LEC [174, 175].

Los resultados de este trabajo revelaron que anticuerpos monoespecíficos contra el II LEC del RM₂ humano (Acs anti-pM₂), obtenidos a partir de la fracción IgG ChD, pueden inducir un incremento de la señal BRET entre RM₂-RLuc y RM₂-YFP de igual magnitud al obtenido en presencia de la fracción IgG ChD completa (Figuras 14 y 15). Más aún, la purificación de la fracción anti-pM₂ a partir de la IgG ChD completa permitió obtener una fracción IgG no-anti-pM₂ que fue incapaz de estimular la señal BRET. Estos resultados indican que: a) la fracción de anticuerpos IgG séricos capaz de modular la interacción RM₂/RM₂ es aquella que reconoce el II LEC del RM₂; b) si bien sería posible que la fracción IgG ChD completa incluya anticuerpos dirigidos a otros dominios del RM₂ diferentes del II LEC, estos no son capaces de modular la interacción RM₂/RM₂ [208]. Por otra parte, el modulador alostérico negativo (NAM) muscarínico galamina inhibió el efecto estimulador de la señal BRET promovido por IgG ChD en condiciones de baja fuerza iónica (las

cuales favorecen las interacciones alostéricas) (Figura 16). Esto sugiere que el NAM compite con el anticuerpo por la interacción con el sitio alostérico común en el II LEC [174, 175, 184], el cual coincide con la región inmunogénica dominante del receptor [173]. En conjunto, estos resultados sugieren que el incremento de BRET entre RM₂-RLuc y RM₂-YFP promovido por Acs anti-RM₂ ocurre a través del reconocimiento del sitio alostérico común en el II LEC de su receptor blanco. Esta conclusión explicaría que ligandos muscarínicos, tales como carbacol o atropina, no modifiquen el efecto de IgG ChD sobre la señal BRET, dado que interactúan con un sitio diferente del RM₂ (el sitio ortostérico).

Con respecto al rol de la valencia de los Acs anti-RM₂ en la modulación de la interacción RM₂/RM₂, se demostró la ineficacia del fragmento monovalente Fab ChD para generar un incremento de BRET entre RM₂-RLuc y RM₂-YFP, lo cual sugiere que el efecto modulador de la interacción receptor/receptor depende de la integridad de las moléculas de anticuerpo (Figura 18). Más aún, la capacidad del anticuerpo anti-Fab humano para restaurar completamente la señal BRET en presencia del fragmento Fab ChD sugiere que la bivalencia de los Acs anti-RM₂ permite establecer enlaces cruzados (“crosslinking”) entre receptores adyacentes, favoreciendo la transferencia de energía entre RLuc e YFP (Figura 18).

En este trabajo no solamente se confirmó la asociación entre la presencia de Acs anti-RM₂ circulantes y disautonomía en los pacientes chagásicos (Tabla 2 y Figura 19A), sino que, además, se demostró que el efecto modulador de los Acs anti-RM₂ sobre la interacción RM₂/RM₂ está asociado a la presencia de disautonomía en los pacientes chagásicos (Figura 19B). Más aún, la distribución de este efecto modulador sobre la interacción RM₂/RM₂ fue semejante a la reactividad sérica anti-pM₂ en los tres grupos de pacientes analizados. De hecho, los 14 pacientes chagásicos disautonómicos seropositivos para Acs anti-RM₂ mostraron un amplio rango de IR con valores proporcionales de Δ BRET, mientras que los sueros seronegativos exhibieron un incremento de BRET dentro de los valores de los pacientes controles. Además, dos pacientes chagásicos no disautonómicos, con reactividad seropositiva anti-pM₂, mostraron incrementos significativos del Δ BRET proporcionales a los valores de IR (Figuras 19A y 19B). En concordancia con estos resultados, se evidenció una correlación positiva entre la reactividad anti-pM₂ y el grado de modulación de la interacción RM₂/RM₂ inducido por la IgG correspondiente (Figura 19C). Esto confirma las observaciones previas sugiriendo que los Acs anti-RM₂ modulan la interacción RM₂/RM₂ a través del reconocimiento del II LEC del RM₂.

En función de estos resultados, se investigaron las implicancias farmacológicas del efecto modulador de la interacción RM₂/RM₂ promovido por Acs anti-RM₂ y el posible rol de las mismas en la etiopatogenia de la disautonomía parasimpática de los pacientes chagásicos crónicos.

6.3. Implicancias farmacológicas de la modulación de la interacción entre RM₂/RM₂ por Acs anti-RM₂ de pacientes chagásicos con disautonomía

En un trabajo previo se aportaron evidencias sugiriendo que la interacción entre RM₂-RLuc y RM₂-YFP expresadas en células HEK 293T genera una señal BRET basal en tiempo real, presuntamente como consecuencia de la formación de homooligómeros constitutivos de RM₂. Ese mismo trabajo ha propuesto que una población de RM₂ expresados en estas células esta constituida predominantemente por homodímeros constitutivos (78%) [100]. Mas recientemente, se utilizaron ensayos de FRET para estimar el tamaño de los oligómeros de RM₂; estos estudios sugirieron una naturaleza tetramérica para este subtipo de RM [105, 106].

En el presente estudio, la exposición de las células expresando RM₂-RLuc y RM₂-YFP a la fracción IgG ChD durante 1 h a 25°C genera incrementos modestos de la señal BRET (10-15 mB). En conjunto, estos hallazgos sugieren que el incremento de la señal BRET en presencia de Acs anti-RM₂ se deba, probablemente, a la estabilización de interacciones receptor/receptor preestablecidas por los anticuerpos bivalentes, más que a un incremento en la proximidad de receptores monoméricos.

Como se mencionó en la introducción, la eficiencia de la transferencia de energía no radiativa entre los componentes del par BRET depende esencialmente de: a) un solapamiento entre los espectros de emisión de la proteína dadora y el espectro de excitación de la proteína aceptora; b) la cercanía entre ambas proteínas; c) la orientación relativa de ambas proteínas. Dado que RLuc e YFP constituyen un par BRET de referencia que cumple con el criterio (a), el incremento de la señal BRET en presencia de los Acs anti-RM₂ se debería a un incremento de la proximidad y/o un cambio en la orientación relativa entre las proteínas dadora y aceptora, favoreciendo una transferencia de energía más eficiente entre las mismas [206]. Debido a que las proteínas RLuc e YFP fusionadas a los extremos C-terminales de sendos RM₂ estan localizadas intracelularmente, y que los Acs anti-RM₂ interaccionan con el II LEC del RM₂, hipotetizamos que los cambios en la proximidad u

orientación relativa de RLuc e YFP son causados por un cambio conformacional en la molécula del receptor generado por la interacción de los anticuerpos con el sitio alostérico.

De acuerdo a este razonamiento imaginamos un escenario en el cual el incremento de la señal BRET estaría reflejando un rearrreglo conformacional en la molécula del receptor unida al anticuerpo, lo cual podría afectar su activación por el agonista farmacológico y la señalización asociada.

6.4. Modulación por IgG ChD de la señalización dependiente de proteína G_i activada por agonista

La rama parasimpática que inerva al corazón (nervio vago) regula el inicio y la propagación de los impulsos eléctricos (a través de la estimulación de los RM_2 de las células nodales y aurículo-ventriculares) y la fuerza contráctil del corazón (a través de la estimulación de los RM_2 expresados principalmente en los miocardiocitos auriculares). Luego de la unión de la ACh, el RM_2 interacciona y activa proteínas $G_{i/o}$, capaces de modular la actividad de canales iónicos, directa o indirectamente, a través de la inhibición de respuestas dependientes de AMPc. Estos eventos bioquímicos resultan en la regulación de la actividad inotrópica, lusitrópica y cronotrópica [111]. En el nodo auricular, la señalización mediada por la proteína $G_{\alpha_{i2}}$ es de gran importancia en la regulación parasimpática de la frecuencia cardíaca. De hecho, la delección selectiva de $G_{\alpha_{i2}}$ en el sistema de conducción del ratón adulto altera la regulación fisiológica del corazón en el animal intacto, promoviendo una pérdida selectiva del HF en el análisis del poder espectral de la HRV [209]. Además, la isoforma de proteína $G_{\alpha_{i2}}$ se requiere para la inhibición muscarínica de la contractilidad y las corrientes de calcio en el miocardio adulto [210].

En este trabajo demostramos que el pretratamiento de los RM_2 con los anticuerpos de la fracción IgG ChD modula la señalización mediada por proteína G_{q15} en presencia de agonista, que se evidencia a través de la inhibición del efecto estimulador del carbacol sobre la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) (Figura 22A y B). Debido a que la proteína G_{q15} deriva de la G_{i2} [123], puede inferirse que la exposición de los RM_2 a la fracción IgG ChD sérica resulta en la inhibición de la vía de la proteína G_{i2} acoplada al RM_2 activado. Estos resultados están respaldados por estudios previos, los cuales sugieren que el pretratamiento de aurículas aisladas de rata con Acs anti- RM_2 de pacientes chagásicos

con disautonomía, induce una inhibición del efecto inotrópico negativo promovido por carbacol (o pilocarpina), es decir un efecto clásicamente mediados por proteína G_i [169, 170, 175, 178].

6.5. Modulación por IgG ChD del reclutamiento de arrestina al RM_2 activado por agonista (señalización independiente de proteína G_i)

La activación de un GPCR por agonista no sólo estimula la señalización mediada por proteína G, sino también la fosforilación del receptor catalizada por GRK y la subsecuente unión de arrestinas al receptor fosforilado. Estos eventos tienen un rol importante en la regulación del receptor y en la señalización independiente de proteína G, como ha sido ampliamente descrito [45, 83, 92]. En particular, la activación de RM_2 por agonista estimula la fosforilación del receptor por GRK2 a nivel del III LIC y el reclutamiento de arrestina en preparaciones de receptor purificado reconstituido o en líneas celulares heterólogas intactas sobreexpresando GRK2 y arrestinas [87]. Además, ha sido demostrado el rol sinérgico de la GRK2 y arrestinas no visuales sobreexpresadas en la desensibilización e internalización del RM_2 en líneas celulares heterólogas y células de aurícula de rata [89, 90]. En nuestro sistema heterólogo de células HEK 293T, GRK2 facilitó el reclutamiento de Arr-2 al RM_2 activado por agonista (Figura 24) y este efecto fue inhibido por los anticuerpos de pacientes ChD en forma dependiente de la concentración (Figura 25).

6.6. Importancia de la bivalencia del anticuerpo en el efecto inhibitorio de los Acs anti- RM_2 sobre la señalización estimulada por agonista

Los efectos inhibitorios de los Acs anti- RM_2 (bivalentes) sobre la activación de proteína $G_{q/15}$ y el reclutamiento de Arr-2 al RM_2 , estimulados por agonistas, no pudieron ser mimetizados por las correspondientes fracciones monovalentes Fab (Figura 22B y 25, respectivamente), sugiriendo que ambos efectos están mediados por *crosslinking* de receptores. Como el efecto modulador de los Acs anti- RM_2 sobre la interacción $RM_2/$ RM_2 también es dependiente de la bivalencia de los anticuerpos (Figuras 18) es razonable inferir que los cambios en la conformación del receptor inducidos por los Acs anti- RM_2 son los que generan, río abajo, los cambios en la señalización dependiente e independiente de proteína en presencia de agonista.

Una evidencia adicional en favor de un mecanismo de activación común para la inhibición por Acs anti-RM₂ de las vías G-dependiente y arrestina dependiente, estimuladas por agonista, surge del análisis de los parámetros farmacológicos de las curvas concentración vs respuesta. En este trabajo se analizaron dos eventos bioquímicos activados por la interacción del RM₂ con el agonista: activación de proteína G_{qi} (valorada en términos de 'incremento de la [Ca²⁺]_i') y reclutamiento de Arr-2 al RM₂ (valorada en términos de ΔBRET). Al comparar las curvas activación de proteína G_{qi} (Figura 20B) y de reclutamiento de Arr-2 al RM₂ (Figura 24B) en función de la concentración de carbacol se obtuvieron valores de EC₅₀ y pendiente de Hill similares, indicando que ambas señales se generan como consecuencia de un mecanismo de activación común.

En segundo lugar, analizamos las curvas de inhibición de la actividad de proteína G_{qi} (Figura 22) y reclutamiento de arrestina (Figura 25) en función de la concentración de IgG ChD. Cuando estas curvas fueron ajustadas por regresión no lineal a un modelo de pendiente variable, se obtuvieron valores de pIC₅₀ y pendiente de Hill similares para ambas vías. Esto sugiere que ambas participan de un mismo mecanismo de acción inhibitorio; es decir que un mismo estado de activación del RM₂ (alterado por el efecto modulador de los Acs anti-RM₂), desencadena ambas señales atenuadas.

6.7. Efecto agonista vs efecto inhibitor de los Acs anti-RM₂

Los Acs anti-RM₂ séricos de pacientes chagásicos con disautonomía no sólo son capaces de inhibir la señalización dependiente de proteína Gi activada por agonista, sino también de activar a su receptor blanco en ausencia de agonista exógeno. Este comportamiento farmacológico semejante al de los agonistas muscarínicos (aunque con menor actividad intrínseca) resulta en la activación de rutas de señalización dependientes de proteína Gi, y en la generación de efectos biológicos asociados [169, 174, 188]. De acuerdo a la literatura la capacidad 'agonista' de los Acs anti-RM₂ exhibe rasgos distintivos respecto a su capacidad 'inhibitoria' de la señalización estimulada por agonista. a) En primer lugar, la actividad 'agonista' de los anticuerpos no parece requerir *crosslinking* de receptores. Por ejemplo, una fracción Fab derivada de un anticuerpo monoclonal anti-*T. cruzi* que reconocía los II LEC del Rβ₁A y del RM₂ logró mimetizar los efectos de la IgG bivalente en su capacidad para activar rutas de señalización mediadas por los Rβ₁A y RM₂, así como los efectos biológicos asociados, sobre el miocardio murino [185]. b) En segundo lugar, los

Acs anti-RM₂ no evidenciaron capacidad para promover el reclutamiento de Arr-2 (de acuerdo al presente estudio) (Figura 26), ni de Arr-3 (datos no mostrados) a su receptor blanco, en ausencia de agonista exógeno. Conjuntamente, estos datos sugieren que la actividad intrínseca de estos ‘anticuerpos agonistas’ está sesgada hacia la vía dependiente de proteínas G, y no requiere *crosslinking* de receptores. En contraste, la actividad inhibitoria de los Acs anti-RM₂ afecta a ambas vías de señalización (dependiente de proteínas G y dependiente de arrestina) estimuladas por agonista, no muestra selectividad funcional y está mediada por *crosslinking* de receptores.

6.8. Posible mecanismo de acción de los Acs anti-RM₂ sobre la modulación de la señalización dependiente e independiente de proteínas G estimulada por agonista.

Los resultados de la presente tesis sugieren que los Acs anti-RM₂ de pacientes chagásicos con disautonomía provocan cambios conformacionales en la molécula de receptor que afectan su activación por el agonista. Esto se evidencia en la disminución de la capacidad del complejo agonista-receptor para estimular la señalización dependiente de proteína G_i y dependiente de Arr-2, de acuerdo a un mecanismo mediado por *crosslinking* de receptores. Los efectos inhibitorios de los Acs anti-RM₂ sobre la señalización dependiente de proteína G_i mediada por agonista avalan los efectos fisiológicos comunicados en trabajos previos, según los cuales la fracción IgG ChD, su fracción F(ab')₂, y su fracción monoespecífica IgG anti-pM₂ son capaces de inhibir, en forma no competitiva, el efecto inotrópico negativo de agonistas muscarínicos en la aurícula aislada [65, 169, 175, 178].

Al profundizar en el mecanismo farmacológico subyacente al efecto inhibitorio de los Acs anti-RM₂ sobre la señalización mediada por agonista, consideramos dos hipótesis:

a) *Regulación del RM₂ a corto plazo:* previamente al hallazgo de los Acs anti-RM₂, numerosas publicaciones proponían que la disautonomía cardiovascular del paciente chagásico implicaba, básicamente, una inhibición de la actividad simpática y parasimpática [143, 211]. En concordancia con esta hipótesis, algunos investigadores sugirieron que la disautonomía chagásica sería una consecuencia de un bloqueo de receptores en ambas ramas del SNA [143].

El hallazgo y caracterización farmacológica de los Acs anti-RM₂ con actividad ‘agonista muscarínica’ [65, 169, 178], las evidencias sobre la fuerte asociación de los mismos

con la disautonomía en pacientes chagásicos crónicos [169, 175], y los recientes hallazgos sobre los procesos de regulación homóloga de GPCR, en particular del RM₂ [77, 212] contribuyeron a generar una nueva hipótesis, según la cual la exposición crónica de los RM₂ cardíacos a los Acs anti-RM₂ circulantes con actividad 'agonista muscarínica' podrían desensibilizar al RM₂, promoviendo desacople de la proteína G, internalización y eventualmente regulación negativa de receptores. Estos mecanismos regulatorios podrían explicar una menor eficacia del agonista muscarínico endógeno ACh en la activación de los RM₂ efectores cardíacos, promoviendo inhibición vagal.

Al evaluar la capacidad de la fracción IgG ChD para regular la expresión y la función del RM₂ a corto plazo, Pérez Leirós y col. lograron determinar que estos anticuerpos mimetizan la acción de ACh para inducir dos efectos asociados con la desensibilización mediada por agonista: a) una disminución de la afinidad en la unión del agonista a RM₂, lo cual ha sido interpretado como 'desacople de la proteína G'; b) el secuestro de RM₂ de la superficie de células CHO expresando RM₂ en forma heteróloga, por lo cual disminuye la población de receptores susceptibles de ser activados por el agonista [171].

En función de estos antecedentes, y los resultados del presente trabajo, nos preguntamos si los Acs anti-RM₂ podrían inhibir el efecto del agonista sobre la señalización del receptor mediante su desensibilización y su secuestro de la superficie celular en nuestro sistema de estudio (HEK 293T). Dado que las arrestinas participan en la desensibilización de la mayor parte de los GPCR, y del RM₂ en particular, promoviendo su desacople de la proteína G_i, evaluamos la capacidad de los Acs anti-RM₂ para promover la interacción entre RM₂ y Arr-2, como indicador indirecto de desensibilización. Como mencionamos anteriormente, la fracción IgG ChD fue incapaz de promover reclutamiento de Arr-2 al RM₂, en ninguna de las concentraciones y tiempos ensayados. Esta fracción de anticuerpos tampoco logró inducir el secuestro de receptores de la superficie celular, tanto en ausencia como en presencia de GRK2 y Arr-2 o Arr-3.

Estos resultados discrepan con los hallazgos de Perez Leirós y col., en el sentido ya que no se obtuvieron evidencias de regulación de RM₂ a corto plazo. Sin embargo, a) Los sistemas celulares de ambos estudios son diferentes (Células CHO heterólogas expresando RM₂ humanos en forma estable vs células HEK 293T expresando RM₂ humanos, con o sin coexpresión de GRK2 y Arr-2 o Arr-3 en forma transitoria). Es posible, entonces, que diferencias en las maquinarias regulatorias de ambas líneas celulares puedan explicar los efectos observados. De hecho, está demostrado que distintos tipos celulares pueden

exhibir propiedades regulatorias diferentes [54]; b) aún considerando la posibilidad de un efecto desensibilizante del RM₂ por los Acs anti-RM₂ en otros tipos celulares, los resultados aquí presentados sugieren que, en un sistema donde resulta improbable un efecto regulatorio (HEK 293T) por parte de los anticuerpos, es posible detectar un efecto inhibitorio de la señalización tanto de la vía dependiente de proteína G como en la vía dependiente de arrestina.

b) *Modulación alostérica negativa*: debido a su capacidad dual para activar directamente rutas de señalización asociadas a proteína G_i y subsecuentes efectos fisiológicos (con eficacia moderada, en comparación con los agonistas muscarínicos totales) y también para inhibir el efecto inotrópico negativo de carbacol y pilocarpina en la aurícula aislada de rata, los Acs anti-RM₂ fueron eventualmente caracterizados como “agonistas muscarínicos parciales” [169, 170, 178]. Sin embargo, años más tarde se demostró que estos anticuerpos no interactúan con el sitio ortostérico del receptor, sino con la región inmunogénica dominante del RM₂, localizada en la secuencia ácida EDGE del II LEC, que coincide con el principal sitio alostérico del receptor. Esto sugiere, en principio, una interacción anticuerpo/receptor de tipo alostérica a través de la cual los Acs anti-RM₂ modulan la actividad de un ligando ortostérico, como es el carbacol. Dado que los Acs anti-RM₂ exhiben un efecto inhibitorio sobre la actividad del agonista, el comportamiento farmacológico de los mismos sería concordante con el de un *modulador alostérico negativo* (NAM). Sin embargo, teniendo en cuenta que los Acs anti-RM₂ presentan actividad muscarínica intrínseca, podría ser más apropiado definirlos como *agonistas alostéricos*.

Existen evidencias en la literatura que apoyan esta hipótesis: a) la fracción IgG Ch inmunorreactiva anti-pM₂ fue capaz de inhibir la unión de antagonistas muscarínicos a membranas de aurículas de rata [169, 170] o porcinas [180], en forma no competitiva. Estos datos son concordantes con una modulación alostérica negativa de la unión de antagonistas al RM₂; b) ensayos de interacción alostérica (en condiciones de baja fuerza iónica) sobre membranas de aurículas porcinas o células CHO-K1 expresando RM₂ mostraron un efecto cooperativo negativo de los anticuerpos IgG séricos sobre la unión de [³H]-NMS [183]; c) Hernandez y col. observaron que los anticuerpos del suero de pacientes chagásicos inducen un incremento en la eficacia de ACh para promover un efecto cronotrópico negativo en el corazón aislado de conejo, así como un incremento en la afinidad de ACh por los RM₂.

Las evidencias obtenidas por Hernández y col. sugiriendo que los Acs anti-RM₂ modulan positivamente el efecto cronotrópico negativo en respuesta a la ACh, parecen discrepar con los resultados presentados en esta tesis, los cuales son congruentes con un efecto inhibitorio de la acción del carbacol. Sin embargo, un exámen detallado de los protocolos experimentales utilizados en ambos estudios permite explicar algunas diferencias. En los ensayos de Hernández y col., los corazones aislados fueron tratados con los anticuerpos séricos y el agonista en forma conjunta durante 4 min, previo al monitoreo de la FC mediante ECG. En nuestro protocolo, las células expresando el RM₂ fueron preincubadas con los anticuerpos durante 30 min, antes de evaluar los efectos del agonista sobre la señalización (tanto dependiente de proteína G como dependiente de arrestina).

Experimentos preliminares de nuestro grupo de trabajo evidenciaron que la incubación de los anticuerpos y carbacol con las células en forma simultánea logra potenciar el efecto de carbacol sobre el reclutamiento de Arr-2 al RM₂. Estos datos sugieren que los Acs anti-RM₂ podrían ejercer un efecto alostérico positivo inicial al actuar conjuntamente con el agonista, en un proceso que no requiere *crosslinking* de receptores. En contraste, la exposición de los RM₂ a los Acs anti-RM₂ durante un período tiempo que permita generar una interacción estable entre ambos -mediante *crosslinking* de receptores- resultaría en un efecto alostérico negativo sobre la acción del carbacol.

6.9. Implicancias fisiopatológicas de los efectos inhibitorios de los Acs anti-RM₂ sobre la señalización mediada por agonista en la enfermedad de Chagas.

Diversas evidencias apoyan la hipótesis de que la disautonomía parasimpática ocurre de manera temprana en el curso de la enfermedad de Chagas y podría estar asociada con un mal pronóstico de la enfermedad [143, 162, 213]. El hallazgo de una correlación positiva entre los niveles de Acs anti-RM₂ y el grado de disfunción parasimpática en pacientes chagásicos crónicos [160] confirmó los hallazgos previos que demostraban una fuerte asociación entre disautonomía y Acs anti-RM₂ [169, 175] y postulaban a estos anticuerpos como un marcador de disautonomía en estos pacientes [179]. En función de estos estudios, se postuló que los Acs anti-RM₂ podrían desempeñar un rol fisiopatológico en la disautonomía parasimpática.

En este trabajo se demostró que la exposición de los RM₂ a los Acs anti-RM₂ de pacientes chagásicos con disautonomía promueve: a) la interacción de los anticuerpos con el

II LEC del RM₂, mediante *crosslinking* de receptores; b) cambios conformacionales en el RM₂, modulando positivamente la interacción receptor/receptor; c) una inhibición en la señalización dependiente de proteína G_i y dependiente de arrestina, probablemente mediante un mecanismo de modulación alostérica negativa.

De acuerdo a estos resultados, se puede concebir el siguiente escenario: la interacción sostenida de los Acs anti-RM₂ con su receptor blanco en células sinoauriculares, aurículo-ventriculares y miocardiocitos auriculares (a nivel de las sinapsis parasimpáticas efectoras), modularía negativamente los efectos de la acetilcolina liberada en la respuesta a la estimulación vagal. Estos efectos podrían contribuir a la disfunción autonómica en la rama parasimpática que inerva al corazón.

Algunos autores proponen que, tanto la actividad agonista muscarínica de los Acs anti RM₂, como el efecto alostérico positivo sobre la acción de la ACh en el miocardio aislado atribuido a estos anticuerpos, podría explicar la presencia de bradicardia y de un incremento en la actividad parasimpática en algunos pacientes seropositivos para Acs anti-RM₂ [191, 214, 215]. En este trabajo, no se encontraron diferencias significativas entre las FC de los pacientes chagásicos disautonómicos (Grupo 1), chagásicos no disautonómicos (Grupo 2) y controles (Grupo 3). Por esta razón, aunque algunos pacientes disautonómicos y no disautonómicos presentaron bradicardia, no se encontró una asociación entre bradicardia y Acs anti-RM₂. Con respecto a las pruebas de disautonomía, los pacientes chagásicos disautonómicos exhibieron una menor relación de Valsalva (RV) respecto al valor de referencia (RV=1,5), mientras que los pacientes no disautonómicos exhibieron valores superiores. Teniendo en cuenta que las alteraciones de FC en la maniobra de Valsalva reflejan alteraciones de la vía parasimpática, nuestros resultados indican una actividad parasimpática disminuida. En conclusión, en el conjunto de pacientes estudiados no se evidenció que la presencia de bradicardia estuviera asociada a la presencia de Acs anti-RM₂ y no se detectó actividad parasimpática aumentada.

La existencia de resultados dispares sobre estos potenciales efectos de los Acs ha generado una controversia, cuya significación fisiopatológica necesita ser esclarecida [211, 214, 215].

7. REFERENCIAS

- [1] Bouvier M. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:274-86.
- [2] Breitwieser GE. G protein-coupled receptor oligomerization: implications for G protein activation and cell signaling. *Circulation research* 2004;94:17-27.
- [3] Sadee W, Hoeg E, Lucas J, Wang D. Genetic variations in human G protein-coupled receptors: implications for drug therapy. *AAPS PharmSci* 2001;3:E22.
- [4] Kobilka BK. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta* 2007;1768:794-807.
- [5] Bohme I, Beck-Sickinger AG. Illuminating the life of GPCRs. *Cell Commun Signal* 2009;7:16.
- [6] Kolakowski LF, Jr. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 1994;2:1-7.
- [7] Satagopam VP, Theodoropoulou MC, Stampolakis CK, Pavlopoulos GA, Papandreou NC, Bagos PG, et al. GPCRs, G-proteins, effectors and their interactions: human-gpDB, a database employing visualization tools and data integration techniques. *Database (Oxford)* 2010;2010:baq019.
- [8] Ji TH, Grossmann M, Ji I. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* 1998;273:17299-302.
- [9] Rovati GE, Capra V, Neubig RR. The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol Pharmacol* 2007;71:959-64.
- [10] Gether U, Kobilka BK. G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* 1998;273:17979-82.
- [11] Rajagopal S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:373-86.
- [12] Hall RA, Premont RT, Lefkowitz RJ. Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J Cell Biol* 1999;145:927-32.
- [13] Milligan G, Kostenis E. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol* 2006;147 Suppl 1:S46-55.
- [14] Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR, et al. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev* 2003;24:765-81.

- [15] Preininger AM, Hamm HE. G protein signaling: insights from new structures. *Sci STKE* 2004;2004:re3.
- [16] Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* 2002;415:206-12.
- [17] Neer EJ. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 1995;80:249-57.
- [18] Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 1991;252:802-8.
- [19] McCudden CR, Hains MD, Kimple RJ, Siderovski DP, Willard FS. G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:551-77.
- [20] Wettschureck N, Offermanns S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 2005;85:1159-204.
- [21] Liu YF, Albert PR. Cell-specific signaling of the 5-HT_{1A} receptor. Modulation by protein kinases C and A. *J Biol Chem* 1991;266:23689-97.
- [22] Liu YF, Ghahremani MH, Rasenick MM, Jakobs KH, Albert PR. Stimulation of cAMP synthesis by Gi-coupled receptors upon ablation of distinct G α protein expression. Gi subtype specificity of the 5-HT_{1A} receptor. *J Biol Chem* 1999;274:16444-50.
- [23] Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996;36:461-80.
- [24] Thomsen W, Frazer J, Unett D. Functional assays for screening GPCR targets. *Curr Opin Biotechnol* 2005;16:655-65.
- [25] Exton JH. Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996;36:481-509.
- [26] Ziembicki J, Tandon R, Schelling JR, Sedor JR, Miller RT, Huang C. Mechanical force-activated phospholipase D is mediated by G α _{12/13}-Rho and calmodulin-dependent kinase in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:F826-34.
- [27] Callaghan B, Koh SD, Keef KD. Muscarinic M₂ receptor stimulation of Cav1.2b requires phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase C, and c-Src. *Circulation research* 2004;94:626-33.
- [28] Mochizuki N, Ohba Y, Kiyokawa E, Kurata T, Murakami T, Ozaki T, et al. Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with G α (i). *Nature* 1999;400:891-4.

- [29] Sun Y, McGarrigle D, Huang XY. When a G protein-coupled receptor does not couple to a G protein. *Mol Biosyst* 2007;3:849-54.
- [30] Carman CV, Som T, Kim CM, Benovic JL. Binding and phosphorylation of tubulin by G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem* 1998;273:20308-16.
- [31] Haga K, Ogawa H, Haga T, Murofushi H. GTP-binding-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) binds and phosphorylates tubulin. *Eur J Biochem* 1998;255:363-8.
- [32] Freeman JL, De La Cruz EM, Pollard TD, Lefkowitz RJ, Pitcher JA. Regulation of G protein-coupled receptor kinase 5 (GRK5) by actin. *J Biol Chem* 1998;273:20653-7.
- [33] Miller WE, Maudsley S, Ahn S, Khan KD, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. beta-arrestin1 interacts with the catalytic domain of the tyrosine kinase c-SRC. Role of beta-arrestin1-dependent targeting of c-SRC in receptor endocytosis. *J Biol Chem* 2000;275:11312-9.
- [34] Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, et al. Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 1999;283:655-61.
- [35] DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Dery O, Mullins RD, Bunnett NW. beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol* 2000;148:1267-81.
- [36] Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, Field ME, Pierce KL, et al. Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:2449-54.
- [37] Stephenson RP. A modification of receptor theory. *Br J Pharmacol Chemother* 1956;11:379-93.
- [38] Reiter E, Ahn S, Shukla AK, Lefkowitz RJ. Molecular mechanism of beta-arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2012;52:179-97.
- [39] Keov P, Sexton PM, Christopoulos A. Allosteric modulation of G protein-coupled receptors: a pharmacological perspective. *Neuropharmacology* 2011;60:24-35.
- [40] Grundmann M, Tikhonova IG, Hudson BD, Smith NJ, Mohr K, Ulven T, et al. A Molecular Mechanism for Sequential Activation of a G Protein-Coupled Receptor. *Cell Chem Biol* 2016;23:392-403.
- [41] Wang L, Martin B, Brenneman R, Luttrell LM, Maudsley S. Allosteric modulators of g protein-coupled receptors: future therapeutics for complex physiological disorders. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;331:340-8.

- [42] Kenakin TP. Biased signalling and allosteric machines: new vistas and challenges for drug discovery. *Br J Pharmacol* 2012;165:1659-69.
- [43] Hodavance SY, Gareri C, Torok RD, Rockman HA. G Protein-coupled Receptor Biased Agonism. *J Cardiovasc Pharmacol* 2016;67:193-202.
- [44] Kenakin T. Biased agonism. *F1000 Biol Rep* 2009;1:87.
- [45] Ferguson SS. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 2001;53:1-24.
- [46] Shenoy SK, Lefkowitz RJ. Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J* 2003;375:503-15.
- [47] Drake MT, Shenoy SK, Lefkowitz RJ. Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circulation research* 2006;99:570-82.
- [48] Pitcher JA, Inglese J, Higgins JB, Arriza JL, Casey PJ, Kim C, et al. Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science* 1992;257:1264-7.
- [49] Hanyaloglu AC, von Zastrow M. Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008;48:537-68.
- [50] Von Zastrow M. Regulation of G-protein coupled receptors by phosphorylation and endocytosis. In: Davis K, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C, editors. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins; 2002. p. 59-70.
- [51] Guo H, An S, Ward R, Yang Y, Liu Y, Guo XX, et al. Methods used to study the oligomeric structure of G-protein-coupled receptors. *Biosci Rep* 2017;37.
- [52] Terrillon S, Bouvier M. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* 2004;5:30-4.
- [53] Eidne KA, Kroeger KM, Hanyaloglu AC. Applications of novel resonance energy transfer techniques to study dynamic hormone receptor interactions in living cells. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13:415-21.
- [54] Ockenga W, Kuhne S, Bocksberger S, Banning A, Tikkanen R. Non-neuronal functions of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. *Genes (Basel)* 2013;4:171-97.
- [55] Borroto-Escuela DO, Agnati LF, Fuxe K, Ciruela F. Muscarinic acetylcholine receptor-interacting proteins (mAChRIPs): targeting the receptorsome. *Curr Drug Targets* 2012;13:53-71.

- [56] Carlson AB, Kraus GP. Physiology, Cholinergic Receptors. StatPearls. Treasure Island (FL)2018.
- [57] Haga T. Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 2013;89:226-56.
- [58] Christopoulos A, Changeux JP, Catterall WA, Fabbro D, Burris TP, Cidlowski JA, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XC. multisite pharmacology: recommendations for the nomenclature of receptor allosterism and allosteric ligands. Pharmacol Rev 2014;66:918-47.
- [59] van Koppen CJ, Nathanson NM. Site-directed mutagenesis of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Analysis of the role of N-glycosylation in receptor expression and function. J Biol Chem 1990;265:20887-92.
- [60] Hayashi MK, Haga T. Palmitoylation of muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes: reduction in their ability to activate G proteins by mutation of a putative palmitoylation site, cysteine 457, in the carboxyl-terminal tail. Arch Biochem Biophys 1997;340:376-82.
- [61] Caulfield MP, Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. Pharmacol Rev 1998;50:279-90.
- [62] Eglen RM. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. Auton Autacoid Pharmacol 2006;26:219-33.
- [63] Kruse AC, Ring AM, Manglik A, Hu J, Hu K, Eitel K, et al. Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. Nature 2013;504:101-6.
- [64] Clark AL, Mitchelson F. The inhibitory effect of gallamine on muscarinic receptors. Br J Pharmacol 1976;58:323-31.
- [65] Gnagey AL, Seidenberg M, Ellis J. Site-directed mutagenesis reveals two epitopes involved in the subtype selectivity of the allosteric interactions of gallamine at muscarinic acetylcholine receptors. Mol Pharmacol 1999;56:1245-53.
- [66] Korczynska M, Clark MJ, Valant C, Xu J, Moo EV, Albold S, et al. Structure-based discovery of selective positive allosteric modulators of antagonists for the M2 muscarinic acetylcholine receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 2018;115:E2419-E28.
- [67] Brodde OE, Korschak U, Becker K, Ruter F, Poller U, Jakubetz J, et al. Cardiac muscarinic receptors decrease with age. In vitro and in vivo studies. J Clin Invest 1998;101:471-8.

- [68] Ehlert FJ, Sawyer GW, Esqueda EE. Contractile role of M2 and M3 muscarinic receptors in gastrointestinal smooth muscle. *Life Sci* 1999;64:387-94.
- [69] Ashkenazi A, Winslow JW, Peralta EG, Peterson GL, Schimerlik MI, Capon DJ, et al. An M2 muscarinic receptor subtype coupled to both adenylyl cyclase and phosphoinositide turnover. *Science* 1987;238:672-5.
- [70] Michal P, El-Fakahany EE, Dolezal V. Muscarinic M2 receptors directly activate Gq/11 and Gs G-proteins. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;320:607-14.
- [71] Lopez-Illasaca M, Crespo P, Pellici PG, Gutkind JS, Wetzker R. Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science* 1997;275:394-7.
- [72] Dhein S, van Koppen CJ, Brodde OE. Muscarinic receptors in the mammalian heart. *Pharmacol Res* 2001;44:161-82.
- [73] Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE. The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* 1987;325:321-6.
- [74] Jones SV. Modulation of the inwardly rectifying potassium channel IRK1 by the m1 muscarinic receptor. *Mol Pharmacol* 1996;49:662-7.
- [75] Crespo P, Xu N, Simonds WF, Gutkind JS. Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 1994;369:418-20.
- [76] Pronin AN, Wang Q, Slepak VZ. Teaching an Old Drug New Tricks: Agonism, Antagonism, and Biased Signaling of Pilocarpine through M3 Muscarinic Acetylcholine Receptor. *Mol Pharmacol* 2017;92:601-12.
- [77] Pals-Rylaarsdam R, Xu Y, Witt-Enderby P, Benovic JL, Hosey MM. Desensitization and internalization of the m2 muscarinic acetylcholine receptor are directed by independent mechanisms. *J Biol Chem* 1995;270:29004-11.
- [78] Richardson RM, Kim C, Benovic JL, Hosey MM. Phosphorylation and desensitization of human m2 muscarinic cholinergic receptors by two isoforms of the beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* 1993;268:13650-6.
- [79] Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 1998;67:653-92.
- [80] Nakata H, Kameyama K, Haga K, Haga T. Location of agonist-dependent-phosphorylation sites in the third intracellular loop of muscarinic acetylcholine receptors (m2 subtype). *Eur J Biochem* 1994;220:29-36.

- [81] Luo J, Busillo JM, Benovic JL. M3 muscarinic acetylcholine receptor-mediated signaling is regulated by distinct mechanisms. *Mol Pharmacol* 2008;74:338-47.
- [82] Willets JM, Challiss RA, Kelly E, Nahorski SR. G protein-coupled receptor kinases 3 and 6 use different pathways to desensitize the endogenous M3 muscarinic acetylcholine receptor in human SH-SY5Y cells. *Mol Pharmacol* 2001;60:321-30.
- [83] van Koppen CJ, Kaiser B. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol Ther* 2003;98:197-220.
- [84] Pals-Rylaarsdam R, Gurevich VV, Lee KB, Ptasienski JA, Benovic JL, Hosey MM. Internalization of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Arrestin-independent and -dependent pathways. *J Biol Chem* 1997;272:23682-9.
- [85] Gurevich VV, Pals-Rylaarsdam R, Benovic JL, Hosey MM, Onorato JJ. Agonist-receptor-arrestin, an alternative ternary complex with high agonist affinity. *J Biol Chem* 1997;272:28849-52.
- [86] Gurevich VV, Richardson RM, Kim CM, Hosey MM, Benovic JL. Binding of wild type and chimeric arrestins to the m2 muscarinic cholinergic receptor. *J Biol Chem* 1993;268:16879-82.
- [87] Gurevich VV, Dion SB, Onorato JJ, Ptasienski J, Kim CM, Sterne-Marr R, et al. Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, beta 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem* 1995;270:720-31.
- [88] Pals-Rylaarsdam R, Hosey MM. Two homologous phosphorylation domains differentially contribute to desensitization and internalization of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 1997;272:14152-8.
- [89] Schlador ML, Nathanson NM. Synergistic regulation of m2 muscarinic acetylcholine receptor desensitization and sequestration by G protein-coupled receptor kinase-2 and beta-arrestin-1. *J Biol Chem* 1997;272:18882-90.
- [90] Yamanushi TT, Shui Z, Leach RN, Dobrzynski H, Claydon TW, Boyett MR. Role of internalization of M2 muscarinic receptor via clathrin-coated vesicles in desensitization of the muscarinic K⁺ current in heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:H1737-46.
- [91] Thangaraju A, Sawyer GW. Comparison of the kinetics and extent of muscarinic M1-M5 receptor internalization, recycling and downregulation in Chinese hamster ovary cells. *Eur J Pharmacol* 2011;650:534-43.

- [92] Zenko D, Hislop JN. Regulation and trafficking of muscarinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 2018;136:374-82.
- [93] Tsuga H, Kameyama K, Haga T, Honma T, Lameh J, Sadee W. Internalization and down-regulation of human muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes. Role of third intracellular m2 loop and G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem* 1998;273:5323-30.
- [94] Tsuga H, Okuno E, Kameyama K, Haga T. Sequestration of human muscarinic acetylcholine receptor hm1-hm5 subtypes: effect of G protein-coupled receptor kinases GRK2, GRK4, GRK5 and GRK6. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;284:1218-26.
- [95] Vogler O, Nolte B, Voss M, Schmidt M, Jakobs KH, van Koppen CJ. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor sequestration and function by beta-arrestin. *J Biol Chem* 1999;274:12333-8.
- [96] Lee KB, Pals-Rylaarsdam R, Benovic JL, Hosey MM. Arrestin-independent internalization of the m1, m3, and m4 subtypes of muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem* 1998;273:12967-72.
- [97] Vogler O, Bogatkewitsch GS, Wriske C, Krummenerl P, Jakobs KH, van Koppen CJ. Receptor subtype-specific regulation of muscarinic acetylcholine receptor sequestration by dynamin. Distinct sequestration of m2 receptors. *J Biol Chem* 1998;273:12155-60.
- [98] Roseberry AG, Hosey MM. Internalization of the M2 muscarinic acetylcholine receptor proceeds through an atypical pathway in HEK293 cells that is independent of clathrin and caveolae. *J Cell Sci* 2001;114:739-46.
- [99] Scherer NM, Nathanson NM. Differential regulation by agonist and phorbol ester of cloned m1 and m2 muscarinic acetylcholine receptors in mouse Y1 adrenal cells and in Y1 cells deficient in cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry* 1990;29:8475-83.
- [100] Goin JC, Nathanson NM. Quantitative analysis of muscarinic acetylcholine receptor homo- and heterodimerization in live cells: regulation of receptor down-regulation by heterodimerization. *J Biol Chem* 2006;281:5416-25.
- [101] Borroto-Escuela DO, Garcia-Negredo G, Garriga P, Fuxe K, Ciruela F. The M(5) muscarinic acetylcholine receptor third intracellular loop regulates receptor function and oligomerization. *Biochim Biophys Acta* 2010;1803:813-25.
- [102] Herrick-Davis K, Grinde E, Cowan A, Mazurkiewicz JE. Fluorescence correlation spectroscopy analysis of serotonin, adrenergic, muscarinic, and dopamine receptor dimerization: the oligomer number puzzle. *Mol Pharmacol* 2013;84:630-42.

- [103] Hern JA, Baig AH, Mashanov GI, Birdsall B, Corrie JE, Lazareno S, et al. Formation and dissociation of M1 muscarinic receptor dimers seen by total internal reflection fluorescence imaging of single molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:2693-8.
- [104] Pediani JD, Ward RJ, Godin AG, Marsango S, Milligan G. Dynamic Regulation of Quaternary Organization of the M1 Muscarinic Receptor by Subtype-selective Antagonist Drugs. *J Biol Chem* 2016;291:13132-46.
- [105] Pisterzi LF, Jansma DB, Georgiou J, Woodside MJ, Chou JT, Angers S, et al. Oligomeric size of the m2 muscarinic receptor in live cells as determined by quantitative fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 2010;285:16723-38.
- [106] Redka DS, Morizumi T, Elmslie G, Paranthaman P, Shivnaraine RV, Ellis J, et al. Coupling of g proteins to reconstituted monomers and tetramers of the M2 muscarinic receptor. *J Biol Chem* 2014;289:24347-65.
- [107] Shivnaraine RV, Huang XP, Seidenberg M, Ellis J, Wells JW. Heterotropic cooperativity within and between protomers of an oligomeric M(2) muscarinic receptor. *Biochemistry* 2012;51:4518-40.
- [108] Patowary S, Alvarez-Curto E, Xu TR, Holz JD, Oliver JA, Milligan G, et al. The muscarinic M3 acetylcholine receptor exists as two differently sized complexes at the plasma membrane. *Biochem J* 2013;452:303-12.
- [109] Liste MJ, Caltabiano G, Ward RJ, Alvarez-Curto E, Marsango S, Milligan G. The molecular basis of oligomeric organization of the human M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol* 2015;87:936-53.
- [110] Alvarez-Curto E, Ward RJ, Pediani JD, Milligan G. Ligand regulation of the quaternary organization of cell surface M3 muscarinic acetylcholine receptors analyzed by fluorescence resonance energy transfer (FRET) imaging and homogeneous time-resolved FRET. *J Biol Chem* 2010;285:23318-30.
- [111] Gordan R, Gwathmey JK, Xie LH. Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. *World J Cardiol* 2015;7:204-14.
- [112] McCorry LK. Physiology of the autonomic nervous system. *Am J Pharm Educ* 2007;71:78.
- [113] Mighiu AS, Heximer SP. Controlling Parasympathetic Regulation of Heart Rate: A Gatekeeper Role for RGS Proteins in the Sinoatrial Node. *Front Physiol* 2012;3:204.
- [114] Brodde OE, Michel MC. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* 1999;51:651-90.

- [115] Ibrahim MM. Localization of lesion in patients with idiopathic orthostatic hypotension. *Br Heart J* 1975;37:868-72.
- [116] Iosa D. Cardioneuropatía chagásica crónica: patogenia y tratamiento. *La enfermedad de Chagas y el Sistema Nervioso*. OPS 1994;6: 109-59.
- [117] Wu P, Brand L. Resonance energy transfer: methods and applications. *Anal Biochem* 1994;218:1-13.
- [118] Pflieger KD, Eidne KA. Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat Methods* 2006;3:165-74.
- [119] Boute N, Jockers R, Issad T. The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:351-4.
- [120] Xu Y, Piston DW, Johnson CH. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:151-6.
- [121] Kostenis E, Waelbroeck M, Milligan G. Techniques: promiscuous G α proteins in basic research and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 2005;26:595-602.
- [122] Milligan G, Rees S. Chimaeric G α proteins: their potential use in drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:118-24.
- [123] Conklin BR, Farfel Z, Lustig KD, Julius D, Bourne HR. Substitution of three amino acids switches receptor specificity of G α_q to that of G α_i . *Nature* 1993;363:274-6.
- [124] Boss V, Talpade DJ, Murphy TJ. Induction of NFAT-mediated transcription by G α_q -coupled receptors in lymphoid and non-lymphoid cells. *J Biol Chem* 1996;271:10429-32.
- [125] Sheu YA, Kricka LJ, Pritchett DB. Measurement of intracellular calcium using bioluminescent aequorin expressed in human cells. *Anal Biochem* 1993;209:343-7.
- [126] Walstab J, Combrink S, Bruss M, Gothert M, Niesler B, Bonisch H. Aequorin luminescence-based assay for 5-hydroxytryptamine (serotonin) type 3 receptor characterization. *Anal Biochem* 2007;368:185-92.
- [127] Le Poul E, Hisada S, Mizuguchi Y, Dupriez VJ, Burgeon E, Detheux M. Adaptation of aequorin functional assay to high throughput screening. *J Biomol Screen* 2002;7:57-65.
- [128] Stables J, Green A, Marshall F, Fraser N, Knight E, Sautel M, et al. A bioluminescent assay for agonist activity at potentially any G-protein-coupled receptor. *Anal Biochem* 1997;252:115-26.
- [129] Kanchiswamy CN, Malnoy M, Occhipinti A, Maffei ME. Calcium imaging perspectives in plants. *Int J Mol Sci* 2014;15:3842-59.

- [130] Inouye S, Noguchi M, Sakaki Y, Takagi Y, Miyata T, Iwanaga S, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:3154-8.
- [131] Thiers CA, Barbosa JL, Pereira Bde B, Nascimento EM, Nascimento JH, Medei EH, et al. Autonomic dysfunction and anti-M2 and anti-beta1 receptor antibodies in Chagas disease patients. *Arq Bras Cardiol* 2012;99:732-9.
- [132] Junqueira LF, Jr. Insights into the clinical and functional significance of cardiac autonomic dysfunction in Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012;45:243-52.
- [133] Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104 Suppl 1:17-30.
- [134] Committee WHOE. Control of Chagas disease. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2002;905:i-vi, 1-109, back cover.
- [135] World Health O. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2012:v-xii, 1-100.
- [136] Nunes MC, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, Ribeiro AL, Council on Chagas Disease of the Interamerican Society of C. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:767-76.
- [137] Sartor P, Colaianni I, Cardinal MV, Bua J, Freilij H, Gurtler RE. Improving access to Chagas disease diagnosis and etiologic treatment in remote rural communities of the Argentine Chaco through strengthened primary health care and broad social participation. *PLoS Negl Trop Dis* 2017;11:e0005336.
- [138] Roca Saumell C, Soriano-Arandes A, Solsona Diaz L, Gascon Brustenga J, Grupo de consenso Chagas APS. [Consensus document for the detection and management of Chagas disease in primary health care in a non-endemic areas]. *Aten Primaria* 2015;47:308-17.
- [139] Mitelman JE. Consenso de Enfermedad de Chagas-Mazza. *Rev Arg Cardiol* 2011;79:544-64.
- [140] Koeberle F. [Chagas' disease-its pathogenesis and significance as an epidemic. (Contribution to the 50th anniversary of the discovery of the disease by Carlos Chagas)]. *Z Tropenmed Parasitol* 1959;10:236-68.
- [141] Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102 Suppl 1:113-22.

- [142] Junqueira LF, Jr. A summary perspective on the clinical-functional significance of cardiac autonomic dysfunction in Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006;39 Suppl 3:64-9.
- [143] Iosa D, Dequattro V, Lee DD, Elkayam U, Caeiro T, Palmero H. Pathogenesis of cardiac neuro-myopathy in Chagas' disease and the role of the autonomic nervous system. *J Auton Nerv Syst* 1990;30 Suppl:S83-7.
- [144] Elizari MV. [Chagasic myocardiopathy: historical perspective]. *Medicina (B Aires)* 1999;59 Suppl 2:25-40.
- [145] Acquatella H. Echocardiography in Chagas heart disease. *Circulation* 2007;115:1124-31.
- [146] Hidron AI, Gilman RH, Justiniano J, Blackstock AJ, Lafuente C, Selum W, et al. Chagas cardiomyopathy in the context of the chronic disease transition. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4:e688.
- [147] Torres-Aguilera M, Remes-Troche JM, Roesch-Dietlen F, Vazquez-Jimenez JG, De la Cruz-Patino E, Grube-Pagola P, et al. [Esophageal motor disorders in asymptomatic subjects with *Trypanosoma cruzi* infection]. *Rev Gastroenterol Mex* 2011;76:199-208.
- [148] Goin JC, Sterin-Borda L, Bilder CR, Varrica LM, Iantorno G, Rios MC, et al. Functional implications of circulating muscarinic cholinergic receptor autoantibodies in chagasic patients with achalasia. *Gastroenterology* 1999;117:798-805.
- [149] Sterin-Borda L, Goin JC, Bilder CR, Iantorno G, Hernando AC, Borda E. Interaction of human chagasic IgG with human colon muscarinic acetylcholine receptor: molecular and functional evidence. *Gut* 2001;49:699-705.
- [150] Jabari S, de Oliveira EC, Brehmer A, da Silveira AB. Chagasic megacolon: enteric neurons and related structures. *Histochem Cell Biol* 2014;142:235-44.
- [151] Berna L, Rodriguez M, Chiribao ML, Parodi-Talice A, Pita S, Rijo G, et al. Expanding an expanded genome: long-read sequencing of *Trypanosoma cruzi*. *Microb Genom* 2018.
- [152] Pinazo MJ, Canas E, Elizalde JI, Garcia M, Gascon J, Gimeno F, et al. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. *Gastroenterol Hepatol* 2010;33:191-200.
- [153] Lázari JO. Alteraciones del Sistema Nervioso Autónomo en la enfermedad de Chagas: Revisión de la literatura. Publicación N° 547: La enfermedad de Chagas y el Sistema Nervioso Autónomo. Washington, D.C., USA: Organización Panamericana de la Salud; 1994. p. 81-106.

- [154] Andrade ZA. Anatomía patológica del Sistema Nervioso Autónomo en la cardiopatía de Chagas. Publicación Científica N° 547: La enfermedad de Chagas y el Sistema Nervioso. Washington, D.C., USA: Organización Panamericana de la Salud; 1994. p. 227-36.
- [155] Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simoes MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 2007;115:1109-23.
- [156] Biolo A, Ribeiro AL, Clausell N. Chagas cardiomyopathy--where do we stand after a hundred years? *Prog Cardiovasc Dis* 2010;52:300-16.
- [157] Caeiro T. Alteración del Sistema Nervioso Autónomo. In: Storino RA, Milei J, editors. *Enfermedad de Chagas*. Buenos Aires, Argentina: Doyma Argentina; 1994. p. 321-30.
- [158] Junqueira LF, Jr., Soares JD. Impaired autonomic control of heart interval changes to Valsalva manoeuvre in Chagas' disease without overt manifestation. *Auton Neurosci* 2002;97:59-67.
- [159] Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation* 1996;93:1043-65.
- [160] Ribeiro AL, Gimenez LE, Hernandez CC, de Carvalho AC, Teixeira MM, Guedes VC, et al. Early occurrence of anti-muscarinic autoantibodies and abnormal vagal modulation in Chagas disease. *Int J Cardiol* 2007;117:59-63.
- [161] Tanowitz HB, Kaul DK, Chen B, Morris SA, Factor SM, Weiss LM, et al. Compromised microcirculation in acute murine *Trypanosoma cruzi* infection. *J Parasitol* 1996;82:124-30.
- [162] Koeberle F. [Cardiopathia parasymphaticopriva]. *Munch Med Wochenschr* 1959;101:1308-10.
- [163] Ribeiro dos S, Hudson L. Denervation and the immune response in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Clin Exp Immunol* 1981;44:349-54.
- [164] Koeberle F. Enteromegaly and Cardiomegaly in Chagas Disease. *Gut* 1963;4:399-405.
- [165] Adad SJ, Cancado CG, Etchebehere RM, Teixeira VP, Gomes UA, Chapadeiro E, et al. Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. *Virchows Arch* 2001;438:254-8.
- [166] Meneghelli UG. Chagasic enteropathy. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004;37:252-60.

- [167] Kierszenbaum F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:210-23.
- [168] Goin JC, Borda E, Segovia A, Sterin-Borda L. Distribution of antibodies against beta-adrenoceptors in the course of human *Trypanosoma cruzi* infection. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991;197:186-92.
- [169] Goin JC, Borda E, Leiros CP, Storino R, Sterin-Borda L. Identification of antibodies with muscarinic cholinergic activity in human Chagas' disease: pathological implications. *J Auton Nerv Syst* 1994;47:45-52.
- [170] Goin JC, Pérez Leirós C, Borda E, Sterin-Borda L. Human chagasic IgG and muscarinic cholinergic receptor interaction: Pharmacological and molecular evidence. *Mol Neuropharmacol* 1994;3:189-96.
- [171] Leiros CP, Sterin-Borda L, Borda ES, Goin JC, Hosey MM. Desensitization and sequestration of human m2 muscarinic acetylcholine receptors by autoantibodies from patients with Chagas' disease. *J Biol Chem* 1997;272:12989-93.
- [172] Magnusson Y, Marullo S, Hoyer S, Waagstein F, Andersson B, Vahlne A, et al. Mapping of a functional autoimmune epitope on the beta 1-adrenergic receptor in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1990;86:1658-63.
- [173] Fu LX, Magnusson Y, Bergh CH, Liljeqvist JA, Waagstein F, Hjalmarson A, et al. Localization of a functional autoimmune epitope on the muscarinic acetylcholine receptor-2 in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1993;91:1964-8.
- [174] Elies R, Ferrari I, Wallukat G, Lebesgue D, Chiale P, Elizari M, et al. Structural and functional analysis of the B cell epitopes recognized by anti-receptor autoantibodies in patients with Chagas' disease. *J Immunol* 1996;157:4203-11.
- [175] Goin JC, Leiros CP, Borda E, Sterin-Borda L. Interaction of human chagasic IgG with the second extracellular loop of the human heart muscarinic acetylcholine receptor: functional and pathological implications. *FASEB J* 1997;11:77-83.
- [176] Goin JC, Perez Leiros C, Borda E, Sterin-Borda L. [Interaction of chagasic autoantibodies with the third extracellular domain of the human heart muscarinic receptor. Functional and pathological implications]. *Medicina (B Aires)* 1996;56:699-704.
- [177] Sterin-Borda L, Cremaschi G, Genaro AM, Echague AV, Goin JC, Borda E. Involvement of nitric oxide synthase and protein kinase C activation on chagasic antibodies action upon cardiac contractility. *Mol Cell Biochem* 1996;160-161:75-82.

- [178] Goin JC, Perez Leiros C, Borda E, Sterin-Borda L. Modification of cholinergic-mediated cellular transmembrane signals by the interaction of human chagasic IgG with cardiac muscarinic receptors. *Neuroimmunomodulation* 1994;1:284-91.
- [179] Goin JC, Borda ES, Auger S, Storino R, Sterin-Borda L. Cardiac M(2) muscarinic cholinceptor activation by human chagasic autoantibodies: association with bradycardia. *Heart* 1999;82:273-8.
- [180] Hernandez CC, Barcellos LC, Gimenez LE, Cabarcas RA, Garcia S, Pedrosa RC, et al. Human chagasic IgGs bind to cardiac muscarinic receptors and impair L-type Ca²⁺ currents. *Cardiovasc Res* 2003;58:55-65.
- [181] Sterin-Borda L, Leiros CP, Goin JC, Cremaschi G, Genaro A, Echague AV, et al. Participation of nitric oxide signaling system in the cardiac muscarinic cholinergic effect of human chagasic IgG. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:1851-65.
- [182] de Oliveira SF, Pedrosa RC, Nascimento JH, Campos de Carvalho AC, Masuda MO. Sera from chronic chagasic patients with complex cardiac arrhythmias depress electrogenesis and conduction in isolated rabbit hearts. *Circulation* 1997;96:2031-7.
- [183] Hernandez CC, Nascimento JH, Chaves EA, Costa PC, Masuda MO, Kurtenbach E, et al. Autoantibodies enhance agonist action and binding to cardiac muscarinic receptors in chronic Chagas' disease. *J Recept Signal Transduct Res* 2008;28:375-401.
- [184] Leppik RA, Miller RC, Eck M, Paquet JL. Role of acidic amino acids in the allosteric modulation by gallamine of antagonist binding at the m2 muscarinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol* 1994;45:983-90.
- [185] Cremaschi G, Fernandez MM, Gorelik G, Goin JC, Fossati CA, Zwirner NW, et al. Modulatory effects on myocardial physiology induced by an anti-*Trypanosoma cruzi* monoclonal antibody involve recognition of major antigenic epitopes from beta1-adrenergic and M2-muscarinic cholinergic receptors without requiring receptor cross-linking. *J Neuroimmunol* 2004;153:99-107.
- [186] Ferrari I, Levin MJ, Elizari MV, Rosenbaum MB, Chiale PA. Cholinergic autoantibodies in sinus-node dysfunction. *Lancet* 1997;350:262-3.
- [187] Altschuller MB, Pedrosa RC, Pereira Bde B, Correa Filho WB, Medeiros AS, Costa PC, et al. [Chronic Chagas disease patients with sinus node dysfunction: is the presence of IgG antibodies with muscarinic agonist action independent of left ventricular dysfunction?]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007;40:665-71.

- [188] Chiale PA, Ferrari I, Mahler E, Vallazza MA, Elizari MV, Rosenbaum MB, et al. Differential profile and biochemical effects of antiautonomic membrane receptor antibodies in ventricular arrhythmias and sinus node dysfunction. *Circulation* 2001;103:1765-71.
- [189] Bilder CR, Goin JC. Gastrointestinal involvement in Chagas disease. *NeuroGastroLatam Rev* 2017;1:168-79.
- [190] Eckberg DL. Parasympathetic cardiovascular control in human disease: a critical review of methods and results. *Am J Physiol* 1980;239:H581-93.
- [191] Neves BC, Bacilio ML, Berrueta L, Salmen S, Peterson DL, Donis JH, et al. Muscarinic antibodies and heart rate responses to dynamic exercise and to the Valsalva maneuver in chronic chagasic patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2013;55:31-7.
- [192] Goin JC, Perez Leiros C, Sterin Borda L. [Identification of antibodies against cardiac muscarinic cholinergic receptors (CMCR) in blood from chagasic patients. Pathogenic implications]. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 1993;43:66-72.
- [193] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
- [194] Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 1990;96:23-8.
- [195] Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilairet S, Chelsky D, Dennis M, et al. Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3684-9.
- [196] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
- [197] Beltrame SP, Auger SR, Bilder CR, Waldner CI, Goin JC. Modulation of M(2) muscarinic receptor-receptor interaction by immunoglobulin G antibodies from Chagas' disease patients. *Clin Exp Immunol* 2011;164:170-9.
- [198] Vatner DE, Sato N, Galper JB, Vatner SF. Physiological and biochemical evidence for coordinate increases in muscarinic receptors and Gi during pacing-induced heart failure. *Circulation* 1996;94:102-7.
- [199] Lee NH, el-Fakahany EE. Allosteric antagonists of the muscarinic acetylcholine receptor. *Biochem Pharmacol* 1991;42:199-205.

- [200] Jakubik J, Bacakova L, El-Fakahany EE, Tucek S. Positive cooperativity of acetylcholine and other agonists with allosteric ligands on muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 1997;52:172-9.
- [201] Maier-Peuschel M, Frolich N, Dees C, Hommers LG, Hoffmann C, Nikolaev VO, et al. A fluorescence resonance energy transfer-based M2 muscarinic receptor sensor reveals rapid kinetics of allosteric modulation. *J Biol Chem* 2010;285:8793-800.
- [202] Jones KT, Echeverry M, Mosser VA, Gates A, Jackson DA. Agonist mediated internalization of M2 mAChR is beta-arrestin-dependent. *J Mol Signal* 2006;1:7.
- [203] Werbonat Y, Kleutges N, Jakobs KH, van Koppen CJ. Essential role of dynamin in internalization of M2 muscarinic acetylcholine and angiotensin AT1A receptors. *J Biol Chem* 2000;275:21969-74.
- [204] Ribeiro AL, Moraes RS, Ribeiro JP, Ferlin EL, Torres RM, Oliveira E, et al. Parasympathetic dysautonomia precedes left ventricular systolic dysfunction in Chagas disease. *Am Heart J* 2001;141:260-5.
- [205] Sterin-Borda L, Borda E. Role of neurotransmitter autoantibodies in the pathogenesis of chagasic peripheral dysautonomia. *Ann N Y Acad Sci* 2000;917:273-80.
- [206] Mercier JF, Salahpour A, Angers S, Breit A, Bouvier M. Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 2002;277:44925-31.
- [207] Wess J. Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function. *Trends Pharmacol Sci* 1993;14:308-13.
- [208] Retondaro FC, Dos Santos Costa PC, Pedrosa RC, Kurtenbach E. Presence of antibodies against the third intracellular loop of the m2 muscarinic receptor in the sera of chronic chagasic patients. *FASEB J* 1999;13:2015-20.
- [209] Zuberi Z, Birnbaumer L, Tinker A. The role of inhibitory heterotrimeric G proteins in the control of in vivo heart rate dynamics. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;295:R1822-30.
- [210] Nagata K, Ye C, Jain M, Milstone DS, Liao R, Mortensen RM. Galpha(i2) but not Galpha(i3) is required for muscarinic inhibition of contractility and calcium currents in adult cardiomyocytes. *Circulation research* 2000;87:903-9.
- [211] Ribeiro ALP, de Carvalho ACC, Lombardi F, Talvani A, Teixeira MM, Rocha MOC. In vivo inhibitory effect of anti-muscarinic autoantibodies on the parasympathetic function in Chagas disease. *Int J Cardiol* 2010;145:339-40.

- [212] Hosey MM, Benovic JL, DeBurman SK, Richardson RM. Multiple mechanisms involving protein phosphorylation are linked to desensitization of muscarinic receptors. *Life Sci* 1995;56:951-5.
- [213] Borda ES, Sterin-Borda L. Antiadrenergic and muscarinic receptor antibodies in Chagas' cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 1996;54:149-56.
- [214] Benchimol-Barbosa PR. Comments on the article by Rallidis et al: "Effects of smoking on myocardial infarction in young people": illicit drug addiction also contributes to major coronary events among youngsters. *Int J Cardiol* 2008;126:284-5; author reply 6-7.
- [215] Davila DF, Donis JH, Davila LA, Odreman WA, de Bellabarba GA, Villarroel V. Anti-muscarinic autoantibodies and vagal modulation in Chagas disease: positive allosteric modulators vs desensitization and downregulation of M2 cardiac acetylcholine receptors. *Int J Cardiol* 2008;123:328-9; author reply 30-2.